

**Die Konsequenzen einer Cobl-Defizienz für die strukturelle
Organisation des murinen Neokortex *in vivo***

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Katrin Pickrodt

geboren am 04.10.1989 in Sömmerda

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Britta Qualmann, Instituts für Biochemie I Universitätsklinikums Jena
2. Herr Prof. Dr. med. Christian Hübner, Institut für Humangenetik Universitätsklinikum Jena
3. Herr Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz Lipmann
Institut Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.01.2016

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cobl	Cordon-Bleu
Ctx	Neokortex (Hirnrinde)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ko	<i>knockout</i>
min	Minute(n)
MW	Mittelwert
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline/Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
v.a.	vor allem
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

2 Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	3
2 Inhaltsverzeichnis	4
3 Zusammenfassung	7
4 Einleitung	9
4.1 Das dynamische Aktinzytoskelett und die Bedeutung der Aktinnukleatoren	9
4.1.1 Der Arp2/3-Komplex und die auf WH2-Domänen basierenden Aktinnukleatoren	10
4.1.2 Der Aktinnukleator Cobl, seine Bindungspartner und seine Rolle in der neuronalen Morphogenese	11
4.2 Der Neokortex von Säugetieren	14
4.2.1 Aufbau des Neokortex von Säugetieren	14
4.2.2 Die Entwicklung des murinen Neokortex	18
4.2.3 Kortikale Malformationen	20
5 Ziele der Arbeit	23
6 Material und Methoden	25
6.1 Material	25
6.1.1 Mauslinien	25
6.1.2 Chemikalien und Laborreagenzien	25
6.1.3 Antikörper und Farbstoffe	27
6.1.4 Geräte	28
6.2 Methoden	30
6.2.1 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten muriner Gehirne	30
6.2.1.1 Transkardiale Perfusionsfixierung und Präparation muriner Gehirne	30
6.2.1.2 Anfertigung von Gehirnschnitten am Schlittenmikrotom und Immunfluoreszenz-Färbung	30
6.2.1.3 Konfokale Laser- <i>Scanning</i> -Mikroskopie	31
6.2.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung der ImageJ-Software und Bildbearbeitung	32
6.2.1.5 Statistik zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen	33
6.2.2 Neuronenfärbung nach Camillo Golgi	33
6.2.2.1 Präparation und Imprägnierung des unfixierten murinen Gehirns	33
6.2.2.2 Gelatinebeschichtung von Objektträgern	34

6.2.2.3 Anfertigung von Gehirnschnitten am Kryostat und Golgi-Färbung einzelner Neurone.....	34
6.2.2.4 Durchlichtmikroskopie.....	35
6.2.2.5 Auswertung Golgi-gefärbter Neurone unter Verwendung der Imaris V7.6-Software	35
6.2.2.6 Statistik zur Auswertung der Golgi-Färbung.....	37
7 Ergebnisse	38
7.1 Analyse der laminaren Organisation im Neokortex von Cobl-ko- Mäusen	38
7.1.1 Veränderungen in der Schichtenausdehnung von Cobl-ko-Mäusen.....	38
7.1.2 Analyse der Kernfläche in den Schichten III, IV und V des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen	44
7.2 Expressionsanalyse von Cobl im wildtypischen Neokortex.....	46
7.3 Auswirkungen der Cobl-Defizienz auf die Morphologie einzelner kortikaler Neurone <i>in vivo</i>	48
7.3.1 Methodische Optimierung der Golgi-Färbung.....	49
7.3.1.1 Optimierung von Färbedauer und Dichte gefärbter Neurone bei der Golgi-Färbung	49
7.3.1.2 Optimierung der Schneidequalität der Mausgehirne bei der Golgi-Färbung.....	51
7.3.2 Analyse der Morphologie des Dendritenbaumes von Schicht V-Pyramidenzellen.	52
7.3.3 Analyse der Morphologie des Dendritenbaumes von Schicht III-Pyramidenzellen	57
8 Diskussion	63
8.1 Der Aktinnukleator Cobl als ein Regulator der neuronalen Schichtenarchitektur	63
8.1.1 Defekte in Zytoskelett-assoziierten Proteinen verursachen strukturelle Organisationsstörungen im Neokortex	63
8.1.2 Cobl verursacht strukturelle Organisationsstörungen im Neokortex	65
8.1.3 Mögliche Ursachen neokortikaler Architekturstörungen unter Cobl-Defizienz.....	67
8.2 Cobl als ein Regulator der Neuromorphogenese	71
8.3 Modell zu den Auswirkungen einer Cobl-Defizienz auf den murinen Neokortex.....	77
9 Schlussfolgerung	80
10 Literaturverzeichnis.....	82
11 Anhang	91
11.1 Abbildungsverzeichnis	91
11.2 Tabellenverzeichnis	92
11.3 Statistische Daten	93

11.3.1 Zusatzmaterial zu ausgewählten Abbildungen	93
11.3.2 Zusätzliche Grafiken	99
11.4 Danksagung	102
11.5 Ehrenwörtliche Erklärung	103
11.6 Lebenslauf	104

3 Zusammenfassung

Die komplexe Struktur der einzelnen Neurone und des Neokortex in seiner Gesamtheit sind die Grundlage für die Verarbeitung kognitiver Funktionen. Die Ausbildung neuronaler Morphologien erfordert eine dynamische Modulation der Filamente des Aktinzytoskeletts, wofür die Initiation der Filamentkeimbildung durch Aktinnukleatoren unter physiologischen Bedingungen unabdingbar ist. Es ist noch wenig über die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge bekannt, die bei Störungen der initialen Stabilisierung von Aktinkeimen auftreten. Die aktinnukleierende Wirkung von Cordon-Bleu (Cobl) wurde erst kürzlich beschrieben und als wesentlich für eine korrekte neuronale Entwicklung erkannt. In vorbestehenden Studien zeigten sich Beeinträchtigungen der Dendritenbaumkomplexität in primären hippocampalen Neuronen in Kultur und in organotypischen Schnittkulturen der Purkinjezellen des Kleinhirns unter Cobl-Defizienz. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen an Cobl-*knockout*(ko)-Mäusen adressieren erstmals die Konsequenzen eines Cobl-ko auf die Architektur des Neokortex *in vivo*.

Im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen zeigte sich nach quantitativer Auswertung immunfluoreszenzgefärbter muriner Gehirnschnitte ein Phänotyp mit starken Unterschieden im Verhältnis der kortikalen Schichten im Vergleich zum Wildtyp (wt), insbesondere im Anteil der Schichten II-IV und V-VI an der Gesamtdicke des Neokortex. Während die Schichten II-IV in ihrer relativen Ausdehnung zunahmen, verringerte sich der Anteil der Schichten V-VI über alle untersuchten Kortextbereiche hinweg. Im medialen Bereich des Kortex kam es zusätzlich zu einem signifikant erhöhten Kernflächenanteil in den Schichten III und IV, welcher als Maß für eine erhöhte Zelldichte in diesen Bereichen diente. So konnten die Auswirkungen der Cobl-Defizienz auf die kortikale Schichtenorganisation *in vivo* gezeigt werden.

Neben der globalen Betrachtung der laminaren Organisation wurden im Rahmen dieser Arbeit Kolokalisationsuntersuchungen durchgeführt, um Hinweise auf den von der Cobl-Defizienz wahrscheinlich betroffenen Neuronentyp zu erhalten. Dabei wurde eine genaue zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Cobl-Expression im Neokortex ermittelt. Es wurde eine Kolokalisation der Signale von Antikörpern gegen Cobl, einem Marker für Projektionsneurone (Pyramidenzellen) und einem Dendritenmarker in den Schichten II-V beobachtet. Da Pyramidenzellen im Neokortex vorrangig in den Schichten III und V lokalisiert sind, wurden nachfolgende Untersuchungen zu Auswirkungen des Cobl-ko auf die

dendritische Morphologie Golgi-gefärbter Neurone, an Pyramidenzellen dieser Schichten durchgeführt.

Durch diese Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Verringerung der dendritischen Komplexität von Schicht III-Pyramidenzellen sowohl in einer Analyse nach Scholl als auch durch eine Reduktion der Häufigkeit der ersten bis sechsten Dendritenordnung, einer Verringerung der Zahl an Verzweigungspunkten und eine deutlich geringere Gesamtfilamentlänge. Der Verzweigungswinkel der Schicht III-Pyramidenzellendendriten aus dem Cobl-ko war jedoch gegenüber dem wt vergrößert. Pyramidenzellen der Schicht V unterschieden sich nach Cobl-ko nicht wesentlich vom wt.

Diese Ergebnisse zeigen die fundamentale Bedeutung des Aktinnukleators Cobl für die Ausbildung der neokortikalen Schichtenorganisation und die Komplexität der dendritischen Arborisierung distinkter Neuronenpopulationen *in vivo*. Die Analysen bilden eine Grundlage für funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung des Cobl-ko und tragen letztendlich zum Verständnis der molekularen Ursachen von Hirnentwicklungsstörungen bei.

4 Einleitung

4.1 Das dynamische Aktinzytoskelett und die Bedeutung der Aktinnukleatoren

Das Zytoskelett einer Zelle ist ein komplexes System aus Proteinpolymeren, welche als zelluläres Gerüst dienen und damit essentiell für die Ausbildung, Stabilisierung und Dynamik der Zellmorphologie sind. Das Zytoskelett einer Zelle ist allerdings keine starre Struktur, vielmehr besitzen die einzelnen Filamente eine komplexe Dynamik, so dass sich Zellen wechselnden Umgebungsbedingungen und differierenden Anforderungen anpassen können. Erst so werden dynamische Vorgänge wie Zellmigration, Neurogenese oder auch Plastizität möglich. Diese Dynamik beruht unter anderem auf dem monomeren Aufbau der polymeren Zytoskelettproteine.

Aktinfilamente, auch Mikrofilamente genannt, sind neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten Teil dieses zellulären Skeletts. Aktin ist ein häufiges Protein in eukaryontischen Zellen. In Vertebraten wird zwischen α -Aktin, β -Aktin und γ -Aktin unterschieden. Während in nicht-muskulärem Gewebe β - und γ -Aktinmoleküle vorkommen (Garrels und Gibson 1976), exprimieren Muskelzellen zusätzlich α -Aktin.

Die 5-7 nm dicken filamentösen Aktinmoleküle (F-Aktin) sind helikale Polymere aus zwei Ketten globulärer Monomere (G-Aktin), die sich in Form einer linksgängigen Helix umeinander winden (Holmes et al. 1990). Bei diesen Monomeren handelt es sich um 42 kDa-Proteine mit einer sehr hoch konservierten Struktur. Jedes Monomer besteht aus vier Subdomänen, von denen jeweils zwei eine durch einen Spalt vom restlichen Protein getrennte Hälfte bilden. In diesem Spalt bindet mithilfe eines Mg^{2+} -Ions ATP (Kabsch et al. 1990). Nachdem sich die Monomere zusammengelagert haben, wird das gebundene ATP durch die ATPase-Aktivität des G-Aktins zu ADP hydrolysiert (Pollard 2007). Durch die Hydrolyse des ATPs wird die Affinität des Monomers zu seinem Bindungspartner reduziert, so dass die Dissoziation erleichtert wird (Straub und Feuer 1950). In lebenden Zellen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Filamentstruktur und den Aktinmonomeren. Da es sich bei den Monomeren um polare Moleküle handelt, sind auch die aus ihnen aufgebauten Aktinfilamente polar. Es wird ein Plus(+)- von einem Minus(-)-Ende unterschieden. Beide Enden besitzen eine unterschiedliche Affinität zu G-Aktin. Bei gleicher zellulärer G-Aktinkonzentration ist die Affinität des Plus-Endes zu den Monomeren größer als die des Minus-Endes. Die G-Aktinkonzentration, bei deren Unterschreitung die Polymerisation der Filamente in eine Depolymerisation umschlägt, wird als kritische Konzentration bezeichnet.

Die kritische Konzentration des Plus-Endes ist kleiner als die des Minus-Endes. Die physiologische Konzentration an Aktinmonomeren ist geringer als die kritische Konzentration des Minus-Endes, aber größer als die des Plus-Endes, so dass G-Aktin am Plus-Ende bevorzugt angelagert wird, während das Filament am Minus-Ende vor allem depolymerisiert. In einem als Tretmühlenmechanismus bezeichnetem Modell, findet netto weder eine Polymerisation noch eine Depolymerisation statt, wenn die zelluläre G-Aktinkonzentration zwischen den kritischen Konzentrationen des Plus- und des Minus-Endes liegt (Wegner 1976). Die Länge des Aktinfilamentes ändert sich in dieser Situation nicht. Dabei werden am Plus-Ende Monomere angelagert, die das Filament „durchwandern“, um am Minus-Ende wieder abzus dissoziieren.

Im Gegensatz zur spontan *in vivo* ablaufenden Polymerisation bereits bestehender Filamente ist die Bildung eines neuen Filamentes aus monomerem Aktin energetisch sehr ungünstig. Die Filamentbildung erfolgt dabei über die Zwischenstufen eines instabilen Aktindimers und eines stabilen trimeren Aktinkeims (Abb. 1). Zur Initiierung eines solchen Keimes sind *in vivo* spezifische Proteine (Nukleatoren) erforderlich (Qualmann und Kessels 2009), die die Monomere in eine räumlich optimale Position zueinander bringen. Die weitere Polymerisation (Filamentelongation) verläuft spontan.

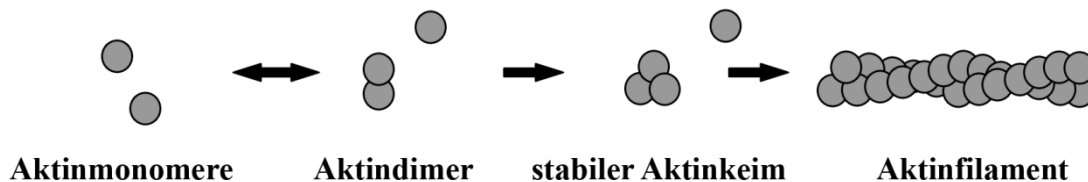


Abb. 1: Die Aktinfilamentbildung aus monomerem G-Aktin. Die Grafik veranschaulicht das Prinzip der Aktinfilamentbildung schematisch. Dabei werden zunächst instabile Dimere und anschließend stabile Trimere gebildet.

4.1.1 Der Arp2/3-Komplex und die auf WH2-Domänen basierenden Aktinnukleatoren

Der Arp2/3-Komplex ist der am besten untersuchte Aktinnukleator. Er besteht aus sieben Proteinuntereinheiten, unter anderem der Arp2 (Actin related protein 2)- und der Arp3-Untereinheit (Pollard und Beltzner 2002, Millard et al. 2004, Pollard 2007). Die Arp2- und die Arp3-Untereinheit ähneln G-Aktinmolekülen. An sie kann sich ein Aktinmonomer anlagern, wodurch ein freies Plus-Ende zur weiteren Polymerisation zur Verfügung steht. Durch die laterale Anlagerung des Arp2/3-Komplexes an ein bereits bestehendes Aktinfilament erhöht sich dessen nukleationsfördernde Wirkung. Aus diesem Grund vermittelt der Komplex vorzugsweise laterale Aussprossungen aus bestehenden Filamenten in einem Winkel von 70° (Pollard und Beltzner 2002). N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich

syndrome protein) interagiert mit dem Arp2/3-Komplex und erhöht dabei seine nukleationsfördernde Wirkung (Machesky et al. 1999).

Im Gegensatz dazu führen die Formine, eine weitere Gruppe von Aktinnukleatoren, zur Ausbildung langer, unverzweigter Aktinfilamente, was besonders während der Zellteilung von funktioneller Bedeutung ist (Goode und Eck 2007). Die Formine bilden mithilfe ihrer FH2 (Formin Homology 2)-Domänen einen Ring um die Plus-Enden der Aktinfilamente (Goode und Eck 2007).

Durch Quinlan et al. (2005) wurde mit Spire der erste Vertreter einer neuartigen Gruppe von Aktinnukleatoren, welche auf WH2-Domänen (*WASP-homology 2*) basieren, beschrieben. Chereau et al. (2008) beschrieben die durch WH2-Domänen vermittelte Aktinnukleation von Leiomodin. WH2-Domänen sind 25 bis 50 Aminosäuren lange Sequenzen, über deren amphipathische N-terminale α -Helix die hydrophobe Tasche der G-Aktinmonomere zwischen den Aktindomänen 1 und 3 gebunden werden kann (Van Troys et al. 1996). Spire kann mit jeder seiner vier WH2-Domänen je ein G-Aktin binden und sie in räumliche Nähe zueinander bringen. Die dadurch vermittelte Aktinnukleation initiiert die Bildung eines kurzen F-Aktinfilamentes, dessen Minus-Ende durch Spire besetzt wird. An dem freien Plus-Ende erfolgt die weitere Assemblierung von G-Aktinmolekülen (Quinlan et al. 2005).

Das vor allem muskulär exprimierte Leiomodin wurde 2001 erstmals durch Conley et al. (2001) beschrieben. Die Ausbildung eines trimeren Aktinkeimes erfolgt hier durch die Rekrutierung eines dritten G-Aktins zu den zwei N-terminal gebundenen G-Aktinmolekülen mittels der C-terminalen WH2-Domäne.

Bereits 1995 wurde das WH2-Domänen enthaltende Cobl-Protein (Cordon-Bleu) durch Gasca et al. (1995) erstmals beschrieben.

4.1.2 Der Aktinnukleator Cobl, seine Bindungspartner und seine Rolle in der neuronalen Morphogenese

Cobl wurde durch eine Genfallen-Insertion detektiert und aufgrund seines Expressionsmusters in axialen Mittellinienstrukturen wie der *Chorda dorsalis* zunächst mit der Ausbildung der Körperachsen während der Embryonalentwicklung in Verbindung gebracht (Gasca et al. 1995). Die komplette Gensequenz sowie die Expression verschiedener Orthologe im Huhn und in der Maus wurden durch Carroll et al. (2003) beschrieben. Auf Grund einer genetischen Interaktion mit Vangl2 (Van Gogh-like 2) gingen Carroll et al. (2003) von einer Beteiligung von Cobl an der Schließung des Neuralrohrs aus. Die Bedeutung von Cobl für die Neurulation

konnte allerdings nicht experimentell bestätigt werden. Durch Ahuja et al. (2007) wurde Cobl erstmals als Aktinnukleator charakterisiert. Ausschlaggebend hierfür waren die drei aktinbindenden C-terminalen WH2-Domänen. Neben der nukleationsfördernden Cobl-Funktion wurde in aktuellen *in vitro* Studien auch eine Rolle von Cobl beim Zerteilen längerer Aktinfilamente in mehrere kurze Filamente beschrieben (Husson et al. 2011, Jiao et al. 2014). Mit Hilfe dieser Funktion stehen wiederum mehr neue Plus-Enden für die Filamentelongation zur Verfügung. Ravanelli und Klingensmith (2011) konnten durch *antisense*-Morpholinos die essentielle Rolle von Cobl in der Entwicklung motiler Cilien im Zebrafährbling (*Danio rerio*)-Embryo zeigen. Dabei ging eine Cobl-Reduktion mit einem reduzierten Gehalt an F-Aktin einher. Ein *knockdown* von Cobl oder seinem Interaktionspartner Syndapin I führte im Zebrafisch zu einem analogen Phänotyp, gekennzeichnet durch eine Verkürzung der Kinozilien und Stereozilien der Haarzellen des Seitenlinienorgans (Schüler et al. 2013). Aktuelle Studien erweitern diese Befunde und beschreiben eine Rolle von Cobl-vermittelter Aktinnukleation bei der Regulation der Mikrovilli-Länge über eine Interaktion mit Proteinen wie Syndapin II (Wayt und Bretscher 2014) die eine BAR (Bin-Amphiphysin-Rev)-Domäne besitzen.

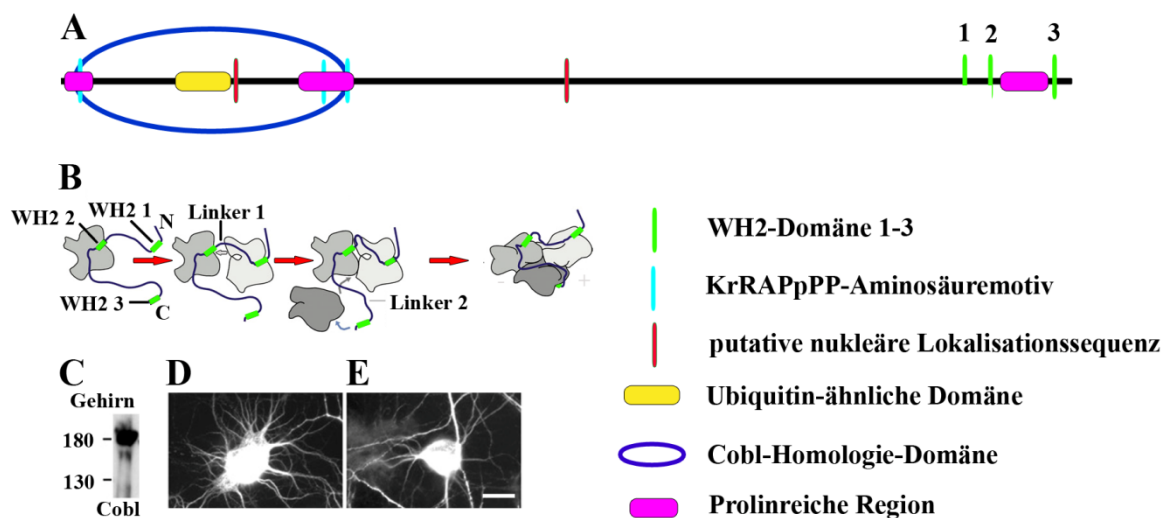


Abb. 2: Domänenstruktur und Funktion des Aktinnukleators Cobl. (A) Cobl besitzt drei C-terminale WH2-Domänen (Nummerierung entsprechend der obenstehenden Zahlen), die durch eine kürzere und eine längere Linkersequenz miteinander verbunden sind. Der N-Terminus besitzt drei auffällige KrRAPpPP-Motive, die die Cobl-Homologiedomäne flankieren. Innerhalb der Homologiedomäne befindet sich eine Ubiquitin-ähnliche Domäne unbekannter Funktion. Weiterhin enthält Cobl zwei putative nukleäre Lokalisationssequenzen und drei prolinreiche Bereiche. Cobl initiiert nach Ahuja et al. (2007) WH2-Domänen vermittelt die Zusammenlagerung zweier Aktin-Monomere (B) zu einem Dimer und die anschließende laterale Anlagerung eines weiteren Monomers zu einem Trimer, welches einen stabilen Aktin-Nukleus darstellt. (C-E) Analysen des Aktinnukleators Cobl durch Ahuja et al. (2007). (C) Westernblot-Analysen aus Gewebekomogenaten adulter Ratten zeigten eine starke Cobl-Expression im Gehirn. (D) Dendritenphänotyp nach Cobl-Überexpression in primären hippocampalen Neuronen am 5. Tag in Kultur und Kontrollzellen (E). Der weiße Maßstabsbalken in E entspricht 15 µm. B-E modifiziert nach Ahuja et al. (2007).

Murines Cobl ist ein 1337 Aminosäuren langes Protein, welches an seinem C-Terminus drei WH2-Domänen aufweist, wobei sich zwischen WH2 1 und 2 sowie zwischen WH2 2 und 3 je eine verbindende Aminosäuresequenz befindet (*Linker 1* und *Linker 2*). *Linker 2* ist länger als *Linker 1* (Abb. 2A). Die WH2-Domänen binden jeweils mit unterschiedlicher Affinität monomeres Aktin (Ahuja et al 2007).

Ahuja et al. (2007) schlugen einen Mechanismus zur Cobl-vermittelten Aktinnukleation vor, nach dem zunächst WH2 2 und dann WH2 1 je ein G-Aktin binden (Abb. 2B), welche sich zu einem longitudinalen Aktindimer verbinden, an dem sich anschließend vermittelt durch WH2 3 und *Linker 2* lateral ein drittes Monomer in kreuzweiser Anordnung zu einem stabilen Aktintrimer anlagert. An dem entstandenen Plus-Ende lagern sich spontan weitere Monomere an. Durch *in vitro*-Experimente mit Mutanten konnten Ahuja et al. (2007) die bedeutende Rolle des C-Terminus für die Aktinnukleatorfunktion des Proteins zeigen. Husson et al. (2011) postulierten ein alternatives Modell der Aktinnukleation durch Cobl. Cobl vermittelt ebenso wie die Formine die Bildung langer unverzweigter Aktinfilamente.

Der Cobl N-Terminus besitzt Bindungsstellen für die Cobl-Interaktionspartner Syndapin I (Schwintzer et al. 2011, Schüler et al. 2013) und Abp1 (Aktin-bindendes Protein 1) (Haag et al. 2012). Abp1 ist ein F-Aktin-bindendes Protein (Kessels et al. 2000), welches an seinem C-Terminus eine SH3 (Src homology 3)-Domäne trägt. Diese Domäne kann mit Prolin-reichen Regionen anderer Proteine, wie Cobl, interagieren (Ahuja et al. 2007). Abp1 und seine Bindungspartner haben Bedeutung für endocytotische Prozesse (Kessels et al. 2001). Abp1 kann vermittelt über N-WASP den Aktinnukleator Arp2/3-Komplex aktivieren und hat dabei eine wesentliche Bedeutung für die Neuromorphogenese (Pinyol et al. 2007). Syndapin I ist ein neuronal exprimiertes Protein, welches von Qualmann et al. (1999) in der Ratte erstmals beschrieben wurde und eine N-terminale F-BAR (Fes/CIP4-homology-Bin-Amphiphysin-Rvs)-Domäne aufweist. Die gebogene Form der Domäne erlaubt über eine Interaktion mit Zellmembranen eine Induktion von Membrantransportprozessen (Peter et al. 2004, Shimada et al. 2007).

Der Aktinnukleator Cobl ist ein neuronal angereichertes Protein, welches bedeutende Funktionen in der neuronalen Morphogenese hat. Bereits Gasca et al. (1995) konnten eine Expression in neuronalen Strukturen wie der *Chorda dorsalis* und der Bodenplatte des Neuralrohres embryonaler Mäuse zeigen. Ahuja et al. (2007) führten *Westernblot*-Analysen mit Gewebehomogenaten der Ratte sowie *in vitro*-Versuche mit primären hippocampalen Neuronen durch. Dabei zeigte sich eine starke Cobl-Expression im Gehirn von adulten Ratten

(Abb. 2C). In embryonalen hippocampalen Neuronen wurde Cobl in Zellkörpern, den Dendriten und den Axonen detektiert (Ahuja et al. 2007). Weiterhin konnte durch RNAi-vermittelten *knockdown* von Cobl und anschließender Immunfluoreszenzfärbung mit MAP2 eine verminderte Anzahl von primären Dendriten sowie ein geringer ausgeprägter Verzweigungsgrad beobachtet werden. Kongruent dazu fand sich nach Cobl-Überexpression eine erhöhte Anzahl an Dendriten sowie eine Vergrößerung der Anzahl dendritischer Verzweigungspunkte auf über 200 % gegenüber Kontrollzellen, bei gleichzeitiger Verringerung der Dendritenlänge (Abb. 2D-E). Auch die axonalen Verzweigungen waren nach Cobl-Überexpression erhöht. Analysen mit Fragmenten des Cobl C-Terminus zeigten die Bedeutung der kompletten Struktur mit allen drei WH2-Domänen und den verbindenden *Linker*-Sequenzen. Fragmente des Cobl C-Terminus ohne WH2-Domäne 1 bzw. 3 führten nicht zur Bildung stabiler Aktintrimere und zeigten auch keinen vom wt differierenden dendritischen Phänotyp.

4.2 Der Neokortex von Säugetieren

4.2.1 Aufbau des Neokortex von Säugetieren

Die Großhirnrinde von Säugetieren ist das Verarbeitungszentrum eingehender Sinnesinformationen. Sie ist durch ein Höchstmaß an Spezialisierung und Komplexität gekennzeichnet und ist dabei funktionell und morphologisch stark arealisiert und differenziert. Der Neokortex ist der umfangreichste und phylogenetisch jüngste Abschnitt der Großhirnrinde (gegenüber dem weniger ausgedehnten, älteren Allokokortex). Der Neokortex wird grob in einen sensorischen und einen motorischen Bereich eingeteilt. In jedem dieser Bereiche gibt es sowohl Areale, die spezifisch mit einer Einzelregion des Körpers verbunden sind, beispielsweise die primär motorische und primär somatosensorische Hirnrinde, als auch solche, die übergeordnete assoziative Funktionen wahrnehmen, wie z. B. der parietale Assoziationskortex (Squire et al. 2003). Das Zusammenspiel der Nervenzellen ist dabei nicht nur Grundlage für reflektorische neuronale Abläufe, sondern auch Voraussetzung für so komplexe Vorgänge wie Bewusstsein, Lernen und Erinnern. Diese Funktionen erfordern eine fein abgestimmte zeitliche und räumliche Koordination distinkter Neuronenpopulationen (Klinke et al. 2010).

Grundsätzlich unterscheidet man als zelluläre Bausteine des Nervengewebes Gliazellen und Nervenzellen (Neurone). Die Gliazellen sind eine zahlenmäßig den Nervenzellen überlegene heterogene Zellgruppe, welche vielfältige stützende und modulierende Funktionen im

neuronalen Stoffwechsel erfüllt (Welsch und Deller 2010). Nervenzellen stellen eine durch diverse Neuronentypen gekennzeichnete, umfangreiche Zellpopulation des Neokortex dar. Neben Interneuronen, die meist lokale Signale vermitteln, leiten Projektionsneurone über lange Axone Informationen in weit entfernte Regionen des ZNS weiter. Pyramidenzellen als größte Gruppe der Projektionsneurone vermitteln in der Regel erregende (exzitatorische) Signale. Neben ihnen existieren auch exzitatorische Sternzellen im Neokortex (sowie im Kleinhirn) (Squire et al. 2003).

Pyramidenzellen zeichnen sich durch einen typischen dreieckigen Zellkörper und davon abgehende Zellfortsätze aus (Abb. 3A) (Welsch und Deller 2010). Bei diesen Fortsätzen kann man ein basal vom Soma abgehendes Axon von apikal und seitlich abgehenden Dendriten unterscheiden. Der Apikaldendrit ist ein besonders kräftig ausgeprägter, von der Spitze des dreieckigen Zellkörpers abgehender Dendrit, der zur *Pia mater* (einem Teil der weichen Hirnhaut) hin gerichtet ist und sich an seinem distalen Ende stark verzweigt. Die Dendriten tragen kleine Ausstülpungen, sogenannte Dornfortsätze (*Spines*) als postsynaptische Strukturen, die die präsynaptischen Endigungen von Axonen anderer Nervenzellen kontaktieren. Die Axone als Efferenz der Nervenzellen ziehen dabei zu anderen Hirnrindenregionen oder zu subkortikalen Strukturen. Sie besitzen keine *Spines*. Der häufigste Neurotransmitter der Pyramidenzellen im Neokortex ist Glutamat (Squire et al. 2003).

Bei Interneuronen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich durch kürzere Axone und das Fehlen von *Spines* auszeichnen. Ihre Zellkörper sind multiform. Die Axone der Interneurone verlassen den Kortex nicht. Interneurone können hemmende oder erregende Funktionen haben, wobei hemmende Interneurone in der Regel GABAerg sind (Squire et al. 2003).

Histologisch entspricht der Neokortex dem Isokortex (Squire et al. 2003), bei dem die verschiedenen Neuronentypen radiär in sechs horizontale Schichten gegliedert sind, im Gegensatz zum dreischichtigen Allokortex. Diese Gliederung wird vorrangig durch die Anordnung der Pyramidenzellen hervorgerufen (Abb. 3B). Beginnend an der *Pia mater* unterscheidet man die *Lamina molecularis* (Schicht I), die *Lamina granularis externa* (Schicht II), die *Lamina pyramidalis externa* (Schicht III), die *Lamina granularis interna* (Schicht IV), die *Lamina pyramidalis interna* (Schicht V) und die *Lamina multiformis* (Schicht VI) (Welsch und Deller 2010). Nach außen hin wird der Neokortex durch die *Membrana limitans gliae superficialis* abgegrenzt, der die *Pia mater* aufliegt. In der Schicht I befinden sich nur wenige Interneurone, die sich flächig verzweigen. In der Schicht II sind

viele, dicht gepackte Interneurone und einige kleine Pyramidenzellen vorhanden. In der Schicht III befinden sich die Zellkörper locker gepackter Pyramidenzellen, deren Größe zur Schicht IV hin zunimmt. Die Schicht IV beinhaltet voranging Interneurone und einen Großteil des Dendritenbaumes der Schicht III-Pyramidenzellen. Afferenzen aus kortikalen und subkortikalen Strukturen, wie z. B. die sensorischen Bahnen aus der Körperperipherie, setzen bevorzugt in dieser Schicht an den Dendriten der Schicht III-Pyramidenzellen an. Damit ist die Schicht IV im sensorischen Neokortex wesentlich stärker ausgebildet als in motorischen Neokortexarealen. Die Schicht V sticht bereits makroskopisch durch ihre großen, locker verteilten Pyramidenzellen hervor. Ihre Axone können besonders lang werden und reichen im motorischen Kortex bis ins Rückenmark. Im sensorischen Kortex ist die Schicht V weniger stark ausgeprägt als im motorischen Kortex. In der Schicht VI finden sich einige kleine Pyramidenzellen und viele morphologisch uneinheitliche Interneurone (Welsch und Deller 2010). Pyramidenzellen befinden sich demnach hauptsächlich in den Schichten III und V des Neokortex, wenngleich alle Schichten von Pyramidenzellfortsätzen durchzogen werden (Abb. 3B) (Squire et al. 2003).

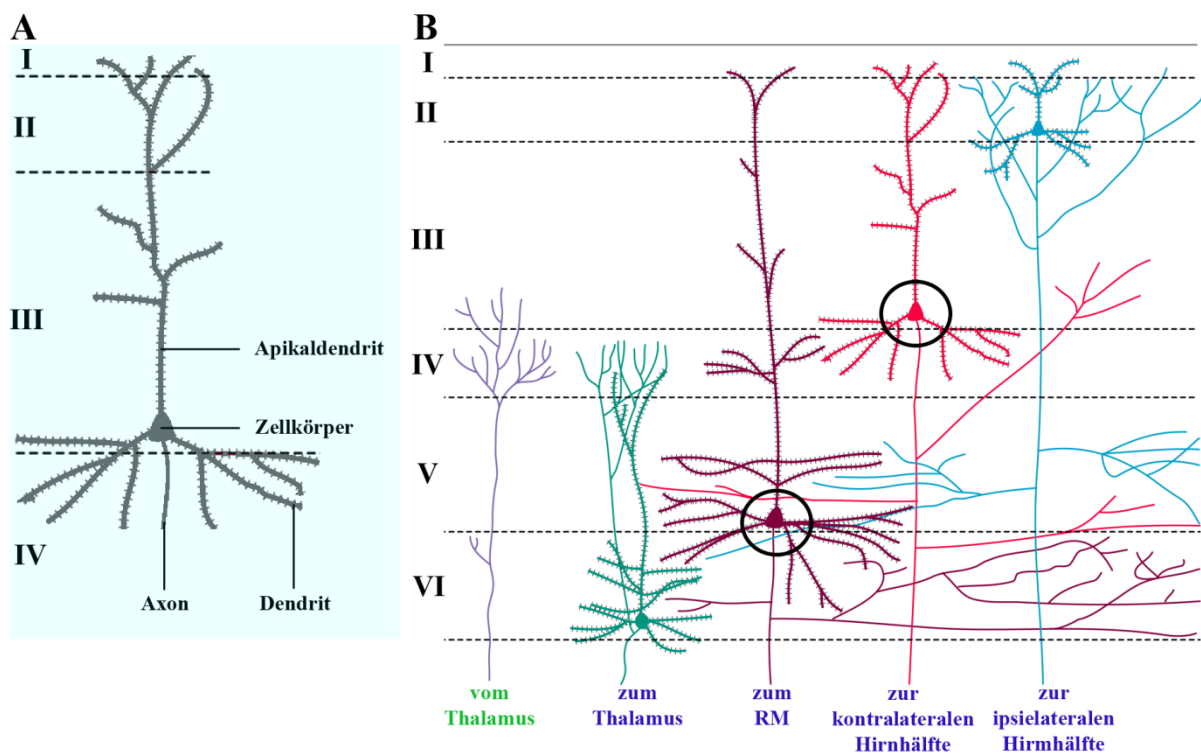


Abb. 3: Die Schichtengliederung des Neokortex. (A) Die Skizze stellt beispielhaft eine Schicht III-Pyramidenzelle dar. Pyramidenzellen können anhand ihres charakteristischen dreieckigen Zellkörpers und ihrer dendritischen Dornfortsätze (*Spines*) erkannt werden. (B) Dargestellt ist die Organisation der Pyramidenzellen innerhalb des sechsschichtigen (I-VI) sensorischen Neokortex von Säugetieren. Pyramidenzellen stellen die Hauptefferenz (blau) des Neokortex dar und erhalten Informationen aus dem Thalamus (grün). Die schwarzen Kreise markieren Zellkörper von Pyramidenzellen der Schichten III und V (Abb. modifiziert nach: Squire et al. (2003)).

Neben der radiären Organisation ist eine Differenzierung des Neokortex in vertikale Einheiten (Kolumnen) möglich. Diese Säulen stellen strukturelle und funktionale Einheiten über alle sechs Schichten dar (Klinke et al. 2010, Welsch und Deller 2010). Die Nervenzellen sind untereinander stark vernetzt und durch hemmende Interneurone funktionell vom umgebenden Gewebe abgegrenzt. Eine Kolumne umfasst mehrere tausend Nervenzellen. Im sensorischen Kortex ist diese Einteilung besonders deutlich. Jede Kolumne bezieht Afferenzen aus subkortikalen Strukturen wie dem Thalamus sowie von anderen kortikalen Kolumnen. Diese enden an den Dendriten von Pyramidenzellen, die die eingehenden Signale verarbeiten. Die Pyramidenzellaxone sind dabei die efferenten Bahnen der Kolumnen. Axone von Schicht II/III-Pyramidenzellen ziehen zu anderen Kolumnen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre, während Axone von Schicht V-Pyramidenzellen zu subkortikalen Strukturen ziehen. Die Kolumnen sind die kleinsten Funktionseinheiten des Neokortex und stellen damit eine Grundvoraussetzung für die Arealisierung dar (Welsch und Deller 2010).

Ein morphologisch gut sichtbares Korrelat der Arealisierung ist das *whisker barrel field* im Nagetier-Neokortex (Abb. 4A). Hierbei handelt es sich um einen Bereich der Schicht IV im sensorischen Neokortex von Nagetieren, in dem Afferenzen aus Rezeptoren in den Tasthaaren enden (Abb. 4B). Diese Afferenzen wurden zuvor im Thalamus umgeschaltet (Guy et al. 2014).

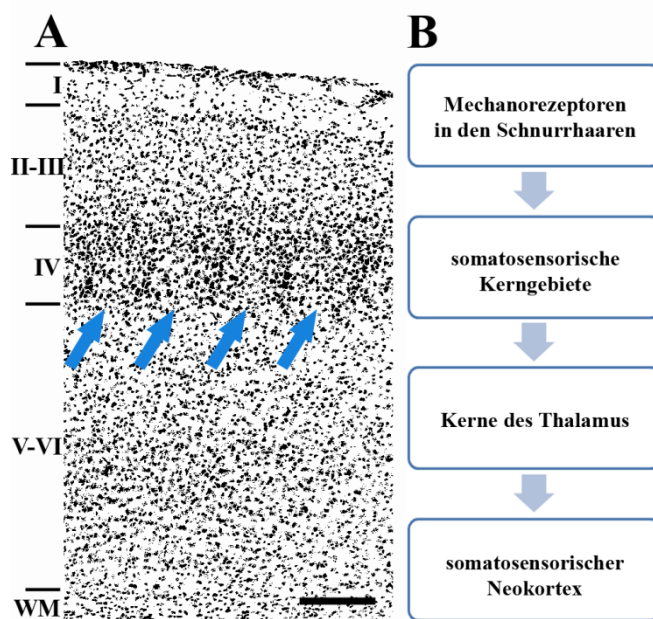


Abb. 4: Whisker barrel field im sensorischen Neokortex. (A) Dargestellt ist ein DAPI-gefärbter, 40 µm dicker Koronalschnitt durch den sensorischen Neokortex einer neun Wochen alten Maus. Die blauen Pfeile markieren die *Barrels* des *whisker barrel fields* in der Schicht IV. Die römischen Zahlen entsprechen den Kortexschichten. (B) Zeigt ein Schema des Informationsflusses der sensorischen Signale aus den Schnurrhaaren einer Maus. Der schwarze Maßstabsbalken entspricht 200 µm. WM: white matter (weiße Substanz)

Diese komplexe Anordnung der kortikalen Nervenzellen in horizontalen und vertikalen Funktionseinheiten setzt eine räumlich wie zeitlich regulierte Abfolge von Prozessen wie Proliferation, Migration und Morphogenese im embryonalen murinen Neokortex voraus.

4.2.2 Die Entwicklung des murinen Neokortex

Die Neurogenese im murinen Neokortex findet zwischen dem 11. und dem 17. Embryonaltag statt (Dehay und Kennedy 2007). Die verschiedenen kortikalen Nervenzelltypen haben einen unterschiedlichen Ursprung innerhalb des embryonalen Vorderhirns der Maus (Abb. 5A). Exzitatorische, glutamaterge Pyramidenzellen und einige Arten von Gliazellen (Oligodendrozyten und Astrozyten) entstehen im dorsalen Bereich des Vorderhirns (dorsales Pallium) (Angevine und Sidman 1961), während inhibitorische, GABAerge Interneurone in einer transienten Struktur des ventralen Vorderhirns (mediale ganglionische Eminenz) entstehen (Kwan et al. 2012). Von hier aus migrieren die Pyramidenzellen radial (Dehay und Kennedy 2007), die Interneurone zunächst tangential und später auch radial an ihren Bestimmungsort im Neokortex (Marin und Rubenstein 2001).

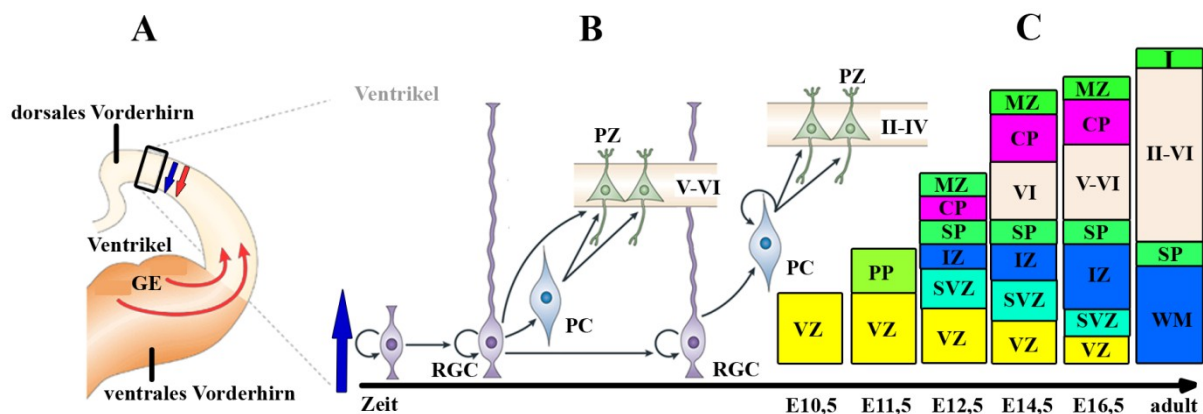


Abb. 5: Die Entwicklung des murinen Neokortex. (A) Schematische Darstellung der Migrationswege sich entwickelnder Interneurone (rote Pfeile) und Pyramidenzellen (blaue Pfeile) im Vorderhirn. Das schwarze Rechteck entspricht einem Ausschnitt des sich entwickelnden Neokortex, welcher in B-C schematisch vergrößert dargestellt ist (Abb. modifiziert nach: Nadarajah und Parnavelas (2002)). (B) Zeigt die Entwicklung (schwarze Pfeile) von Pyramidenzellen (PZ) direkt aus den Radialgliazellen (RGC) oder über Zwischenstufen neuronaler Vorläuferzellen (PC, *progenitor cells*). Dieser Prozess beginnt bereits vor dem 10. Embryonaltag mit der Entstehung der Radialgliazellen aus Vorläuferzellen. Der blaue Pfeil verdeutlicht die radiale Wanderungsrichtung der neu entstandenen Neurone entlang der Radialgliazellen (Abb. modifiziert nach: Molyneaux et al. (2007)). (C) Veranschaulicht die Differenzierung der Neokortexschichten aus der Ventrikularzone zwischen dem Embryonaltag 10,5. und 16,5. Gleiche Farben veranschaulichen einen gemeinsamen embryonalen Ursprung der Schichten (Abb. modifiziert nach: Molyneaux et al. (2007)). CP: kortikale Platte (*cortical plate*), E: Embryonaltag, GE: *Ganglion eminencium*, IZ: Intermediärzone (*intermediate zone*), MZ: Marginalzone, PP: *Preplate*, SP: Subplatte, SVZ: Subventrikularzone, VZ: Ventrikularzone, WM: *white matter* (weiße Substanz), römische Ziffern definieren die einzelnen Neokortexschichten.

Im dorsalen Vorderhirn werden zwei Wachstumszonen unterschieden. Die primäre Wachstumszone ist das Neuroepithel der Ventrikularzone. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung neuronaler Vorläuferzellen in direkter Nähe der Hirnventrikel. Die neuronalen Vorläuferzellen des Neuroepithels teilen sich in den ersten Embryonaltagen mehrfach und bilden erste frühe Neurone (Cajal-Retzius-Zellen (Meyer et al. 1999)), welche in die Marginalzone migrieren. Ab dem Embryonaltag 10,5 gehen aus diesen Teilungen nicht nur weitere Vorläuferzellen sondern auch so genannte Radialgliazellen (*Radial glia cells*) hervor (Abb. 5B), ein Prozess, welcher mit der Expression spezifischer Gliamarker wie BLBP und GLAST verbunden ist (Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009). Die Radialgliazellen erfüllen mehrere fundamentale Aufgaben während der Neurogenese. Aus ihnen entwickeln sich zum einen direkt glutamaterge Projektionsneurone und zum anderen neuronale Vorläuferzellen, welche in die sekundäre Wachstumszone, die Subventrikularzone, migrieren und sich dort weiter teilen. Die ersten neu entstandenen Neurone bilden am Embryonaltag 11,5 die *Preplate* an der zum Ventrikel gerichteten Kortexseite (Abb. 5C). Zwischen dem 12. und 13. Embryonaltag migrieren Projektionsneurone aus der Ventrikularzone entlang der Radialgliazellen nach apikal, wo sie die kortikale Platte bilden (zusammengefasst in (Molyneaux et al. 2007, Dehay und Kennedy 2007, Kwan et al. 2012)). Die Radialgliazellen bilden hierbei das Gerüst für die radiale Migration der Projektionsneurone (Rakic 1988, Molyneaux et al. 2007). Die kortikale Platte teilt nun die *Preplate* in die apikal liegende Marginalzone und die basal liegende Subplatte (Marin-Padilla 1978). Die Marginalzone enthält nur wenige Neurone. Die Subplatte wird von der Subventrikularzone durch eine Schicht von Nervenfasern abgetrennt. Diese zellarme, als Intermediärzone bezeichnete Schicht wird im adulten Organismus zur weißen Substanz (Kwan et al. 2012). Im Laufe der späteren Embryonalentwicklung differenzieren sich die Radialgliazellen in Astrozyten und Oligodendrozyten oder bilden Vorläuferzellen für diese (Pinto und Gotz 2007). Aus der Marginalzone geht später die Schicht I des Neocortex hervor, während die kortikale Platte die Schichten II-VI bildet (Kwan et al. 2012). Diese gliedern sich im adulten Organismus wiederum in die oberen (Schicht II-IV) und unteren (Schicht V und VI) neokortikalen Neuronenpopulationen. Nervenzellen werden zu Beginn der Neurogenese (zwischen dem 11. und 14. Embryonaltag) vor allem aus Vorläuferzellen in der Ventrikularzone gebildet, während die Zellen zwischen dem 14. und 17. Embryonaltag vorrangig aus der Subventrikularzone stammen. Der Tag der letzten Zellteilung scheint entscheidend für die spätere Positionierung der Zellen zu sein (Kandel et al. 1996). Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren steuern den chronologischen Ablauf der Neurogenese. Ein spezifischer

Transkriptionsfaktor der oberen kortikalen Neuronenpopulationen ist Cux1 (Dehay und Kennedy 2007). SatB2 wird besonders stark in Projektionsneuronen der kortikalen Schichten II bis V exprimiert (Kwan et al. 2012). Durch Zellmarkierungsexperimente mit radioaktiv-markiertem Thymidin in Neuroblasten konnte gezeigt werden, dass zunächst die tieferen Rindenschichten und erst anschließend die oberen Schichten des Neokortex gebildet werden (Caviness 1982). Dabei migrieren alle neugebildeten Zellen radial entlang der Radialgliazellen durch die bereits zuvor gebildeten Schichten (Rice und Curran 2001). In der Schicht II befinden sich so die jüngsten, in der Schicht VI die ältesten Zellen (*inside-first/outside-last-Prinzip*) (Molyneaux et al. 2007). An die Migration der Zellen schließt sich eine Phase der Differenzierung und Morphogenese an, welche auch zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig abgeschlossen ist.

Die hoch organisierte Anordnung der verschiedenen Nervenzelltypen im adulten sechsschichtigen Neokortex setzt somit eine geordnete Proliferation und Wanderung der Nervenzellen während ihrer Entwicklung voraus. Störungen dieser Prozesse können zu kortikalen Malformationen führen.

4.2.3 Kortikale Malformationen

Klinisch-neurologischen Syndromen wie Epilepsien und Schizophrenien liegen oft Störungen der neuronalen Architektur auf Zellebene zu Grunde. Tayler et al. (1971) beschrieben 10 Patienten mit therapieresistenten Epilepsien, die sich einem chirurgischen Eingriff unterzogen. Die Operationspräparate offenbarten in der Mikroskopie eine veränderte Histopathologie der Zellen (meist große, balloniert wirkende Zellen) kombiniert mit verschiedenen Störungen der kortikalen Organisation. Durch diesen Befund wurde der Begriff der fokalen kortikalen Dysplasie (FCD) für eine heterogene Gruppe umschriebener neuronaler Herde gestörter kortikaler Schichtung, Zytoarchitektur und abnormer Faserstruktur geprägt (Palmini et al. 2004). Inzwischen gilt die FCD als die häufigste angeborene Fehlbildung, die eine therapierefraktäre Epillepsie verursacht (Lee und Kim 2013). Weitere Untersuchungen klassifizierten die FCD als Untergruppe der kortikalen Malformationen. Der Begriff der kortikalen Malformation wurde zur Charakterisierung eines Symptomkomplexes bei Kindern mit Entwicklungsverzögerungen und jungen Menschen mit Epilepsien eingeführt (Barkovich et al. 1996). Kortikale Malformationen werden dabei nach ihrer Kausalität eingeteilt (Barkovich et al. 2012). Dabei wird zwischen (I) Malformationen aufgrund abnormaler neuronaler und bzw. oder glialer Proliferation oder Apoptose, (II) Malformationen durch neuronale Migrationsdefekte und (III) Malformationen durch Störungen der

postmigratorischen Entwicklung unterschieden. Gruppe I beinhaltet globale kortikale Anomalien wie Mikro- und Megaenzephalie sowie fokale oder diffuse Dysgenesien mit abnormaler Zellproliferation. Die Gruppe II lässt sich wiederum hinsichtlich der zeitlichen Abfolge der Zellmigration in vier Untergruppen unterteilen: Malformationen durch Defekte der Initiation der Migration im Neuroepithel (z. B. periventrikuläre Heterotopien), generalisierte (z. B. Lissenzephalie) und lokalisierte (z. B. subkortikale Heterotopien) Störungen der transhemisphärischen Migration sowie Defekte der Migrationstermination (*Cobblestone* (Pflasterstein)-Malformation). Die Gruppe III beinhaltet neben den Krankheitsbildern der Polymikrogyrie und der Schizenzephalie (Spaltbildungen zwischen dem Ependym und der Kortexoberfläche) auch die postmigratorische Mikrozephalie und die FCD. Die FCD kann nach Palmini et al. (2004) wiederum in mehrere Untergruppen eingeteilt werden. In den letzten Jahren sind die molekularbiologischen Grundlagen dieser Entwicklungsstörungen zunehmend Gegenstand wissenschaftlicher Studien.

Zytoskelettbestandteile sind wesentliche Komponenten vieler grundlegender zellphysiologischer Prozesse wie Proliferation, Migration und Morphogenese und können deshalb bei Funktionsstörungen alle Gruppen kortikaler Malformationen hervorrufen. Mutationen im *WDR62*-Gen, dessen Genprodukt mit den Zentrosomen einer Zelle assoziiert ist, verursachen Störungen der Mitosespindelausbildung und führen so zu Malformationen der Gruppe I, wie Mikrozephalie (Bilguvar et al. 2010). Beeinträchtigungen der Zellmigration (Gruppe II) durch Defekte des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Doublecortin führen beim Menschen zum *Double cortex*-Syndrom oder zur X-chromosomalen Lissenzephalie (Gleeson et al. 1998). Fronto-parietale Polymikrogyrie, ein Syndrom der Gruppe III, wird durch Mutationen im für Beta-Tubulin kodierendem Gen *TUBB2B* hervorgerufen (Jaglin et al. 2009).

Entwicklungsdefekte, die auf Veränderungen von Zytoskelettkomponenten beruhen, können somit im Gehirn zu schwerwiegenden klinischen Folgen führen. Für eine Reihe von Zytoskelett-assoziierten Proteinen wie Cdc42 (Cappello et al. 2006) und RhoA (Cappello et al. 2012) oder NIMA-GAP (Rosario et al. 2012) wurden zum Teil drastische Effekte auf die kortikale Architektur nach genetischer Deletion beschrieben. Die GTPase RhoA ist ein zentrales, das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett regulierendes Protein, dessen Defizienz unter anderem zu Störungen der laminaren Organisation des murinen Neokortex führt. Dabei konnte durch *in utero*-Elektroporation ein Zusammenhang zwischen der genetischen Deletion von RhoA mit den durch neuronale Migrationsdefekte hervorgerufenen Krankheitsbildern des

Cobblestone-Kortex und der subkortikalen Bandheterotopie nachgewiesen werden (Cappello et al. 2012).

Neben strukturellen neuronalen Anomalien zeigen aktuelle Assoziationsstudien auch eine Korrelation zwischen Mutationen in Genen, die für Zytoskelettkomponenten kodieren und psychiatrischen Syndromen. So konnten Mutationen im *Cobl*-Gen mit der Entstehung von Autismus in Zusammenhang gebracht werden (Hussman et al. 2011, Griswold et al 2012).

5 Ziele der Arbeit

Das Aktinzytoskelett ist durch seine stützende Filamentstruktur Grundlage der zellulären Stabilität und damit die Voraussetzung für die Ausbildung der komplexen Morphologie kortikaler Neurone. Darüber hinaus ermöglicht die kontinuierliche Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente dynamische Prozesse wie Zellteilung und Migration, welche sowohl während der Embryonalentwicklung als auch postnatal fundamental für Wachstum und Differenzierung sind. Aktinnukleatoren sind essentiell für die Initiation der Aktinfilamente *in vivo*. Neben den bereits gut etablierten Aktinnukleatoren Arp2/3 und Forminen (Pollard und Beltzner 2002, Pollard 2007), wurde in der Arbeitsgruppe mit Cobl ein neuartiger Aktinnukleator beschrieben (Ahuja et al. 2007).

Cobl ist ein vorrangig neuronales Protein, welches bereits während der Embryonalentwicklung im Nervensystem exprimiert wird und von Bedeutung für die korrekt verlaufende Dendritogenese ist (Gasca et al. 1995, Carroll et al. 2003, Ahuja et al. 2007). Unter Cobl-Defizienz zeigten sich in vorbestehenden Studien drastische Auswirkungen auf die Morphologien dissoziierter primärer hippocampaler Neurone (Ahuja et al. 2007) und cerebellärer Purkinjezellen in Schnittkulturen (Schwintzer et al. 2011, Haag et al. 2012). Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen, die transiente oder persistierende Entwicklungsdefekte im Neokortex *in vivo* adressieren. Diese Lücke soll die vorliegende Arbeit durch die Analyse von Cobl-ko-Mäusen schließen.

Der Neokortex ist das Verarbeitungszentrum eingehender Sinnesinformationen und durch ein Höchstmaß an Spezialisierung und Komplexität gekennzeichnet. Die differenzierten kognitiven Funktionen erfordern eine geordnete kortikale Schichtung sowie die umfangreiche Konnektivität der Neurone innerhalb und zwischen den Schichten, was nur durch eine korrekte Ausbildung der dendritischen und axonalen Zellfortsätze möglich ist. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des Aktinnukleators Cobl auf die kortikale Organisation und die dendritische Komplexität kortikaler Neurone durch Phänotypanalysen nach genetischer Deletion von Cobl untersucht werden. Veränderungen der laminaren Organisation des Neokortex sollen durch Marker für distinkte kortikale Schichten qualitativ und quantitativ aufgezeigt werden. Ergänzend soll die Dichte der Zellpopulationen in den relevanten Schichten bestimmt und die Ausdehnung dieser Schichten gemessen werden. Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Cobl sowie gegen Marker für distinkte kortikale Neuronentypen sollen zudem Aufschluss über die genaue Zuordnung der Cobl-Expression zu distinkten Neuronenpopulationen und zu subzellulären Kompartimenten kortikaler Neurone geben.

Zusätzlich sollen einzelne Neurone im Hirnschnitt mittels Golgi-Färbetechnik *in situ* markiert und die Morphologie der als Cobl-exprimierend detektierten Neurone unter anderem mit etablierten Verfahren wie der Scholl-Analyse ausgewertet werden.

Mit den geplanten Analysen können wichtige neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Auswirkungen des Verlustes des Aktinnukleators Cobl auf die strukturelle Organisation des murinen Neokortex in seiner Gesamtheit sowie auf die Morphologie einzelner Zellen gewonnen werden. Diese Erkenntnisse sind entscheidend für das Verständnis der Cobl-Funktion im Neokortex. Diese Daten können letztlich die Kenntnisse der Pathomechanismen kortikaler Entwicklungsstörungen, die auf Störungen von Zytoskelettkomponenten beruhen, vertiefen.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Mauslinien

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Gehirnschnitten der Maus (*Mus musculus*) durchgeführt, wobei wildtypische und Cobl-ko-Mäuse aus eigener Zucht verwendet wurden. Diese wurden in der Arbeitsgruppe durch Deletion des Exons 11 des Cobl-Gens mittels Cre/loxP-System generiert (Tierversuchsantrag Reg.-Nr. 02-011/10). Die Tiere wurden unter 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Alle verwendeten Tiere wurden zum Zweck der Organentnahme getötet. Es wurden keine Tierversuche im Sinne des Tierschutzgesetzes durchgeführt (§7 TierSchG).

6.1.2 Chemikalien und Laborreagenzien

Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Bovines Serumalbumin (10x)	New England Biolabs® Inc. GmbH, Ipswich, MA
Ethylenglykol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fluoromount-G™	Southern Biotech, Birmingham, USA
Gelatine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glucose	Roth, Karlsruhe
DAPI	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	Gibco® Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Heidelberg
Triton® X-100	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Ziegennormalserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Kits

FD Rapid GolgiStain™ Kit	FD Neuro Technologies, Inc., Columbia, USA
Roti®-Histokitt II	Roth, Karlsruhe

Lösungen und Puffer

Anti- <i>Freezing</i> -Lösung	833 mM Glukose 3,1 mM Natriumazid 33 % (v/v) Ethylenglykol 500 ml Phosphatpuffer 1 pH 7.4 bidestilliertes Wasser ad 1 Liter
Beschichtungslösung für Objektträger	0,05 % (w/v) $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ 0,3 % (w/v) Gelatine erhitzt auf 60 °C
Blockierlösung 1 für Immunfluoreszenzfärbung	5 % (v/v) Ziegennormalserum 0,25 % (v/v) Triton [®] X-100 in 0,1 M Phosphatpuffer 2
Blockierlösung 2 für Immunfluoreszenzfärbung	2 % (w/v) BSA 10 % (v/v) Pferdeserum in PBS (pH 7,4)
Färbelösung (zur Golgi-Färbung gemäß des FD Rapid GolgiStain [™] Kit)	Solution D, Solution E und bidestilliertes Wasser im Verhältnis 1:1:2
Imprägnierungslösung (zur Golgi-Färbung gemäß des FD Rapid GolgiStain [™] Kit)	Solution A und Solution B im Verhältnis 1:1
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,13 mM Na_2HPO_4 1,76 mM KH_2PO_4
PFA 4 % (w/v)	4 g PFA 100 ml 1x PBS Titration mit 0,1 M NaOH auf pH 7,2
Phosphatpuffer 1	700 ml bidestilliertes Wasser 1,75 mM NaH_2PO_4 Titration mit 80 mM Na_2HPO_4 auf pH 7,4 bidestilliertes Wasser Ad 1 Liter

0,1 M Phosphatpuffer 2

77,4 mM Na₂HPO₄22,6 mM NaH₂PO₄

bidestilliertes Wasser ad 1 Liter

5 %/10 %/30 %ige Saccharose-Lösung

5 %/10 %/30 % (w/v) Saccharose in PBS

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Karl Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Pufferlösungen, Medien und Zusätze wurden entsprechend der jeweiligen Protokolle unter Verwendung von bidestilliertem Wasser aus der Reinstwasser-Anlage Milli-Q[®] Gradient (Millipore, Billerica, USA) hergestellt.

6.1.3 Antikörper und Farbstoffe

Die verwendeten Antikörper sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, polyklonal. Die sekundären Antikörper sind gegen die leichte Kette von IgG-Molekülen gerichtet.

Spezifität	Antigen	Spezies	Verdünnung	Quelle
anti-Cobl ^{DBY}	Cobl AS 750-1005 (GI 32441275)	Meerschweinchen	1:500	(Schwintzer et al. 2011)
anti-EAAC1	Excitatory amino-acid transporter	Ziege	1:5000	Millipore TM
anti-MAP2	Mikrotubuli- assoziiertes-Protein	Maus	1:500	Sigma
anti-Cux1/CDP	CCAAT displacement protein	Kaninchen	1:100	Santa Cruz
anti-SatB2 (monoklonal)	Spezial AT-rich Bindeprotein 2	Maus	1:50	Santa Cruz

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Gekoppelt mit	Verdünnung	Quelle
Meerschweinchen	Esel	Alexa Fluor [®] 488	1:500	Dianova
Ziege	Esel	Alexa Fluor [®] 647	1:500	Invitrogen
Maus	Esel	Alexa Fluor [®] 568	1:500	Invitrogen
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor [®] 568	1:500	Invitrogen
Maus	Esel	Alexa Fluor [®] 488	1:500	Invitrogen

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

6.1.4 Geräte**Kryostat**

Open-Top-Kryostat CM 3050S Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Mikroskope

Epifluoreszenzmikroskop

Axio Observer.Z1 Carl-Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
ausgestattet mit

AxioCam MRm CCD Kamera

Konfokales Laser-*Scanning*-Mikroskop

LSM Leica TCS SP5 Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Mikrotom

Schlittenmikrotom

Leica SM 2010R Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Präparierbesteck FST und Carl Roth

Quecksilberdampf Lampe

HXP 120 Leistungselektronik JENA GmbH, Jena

Schlauchpumpe

Minipuls 3 Gilson, Inc., Middleton

Software

Adobe Photoshop CS2 Adobe Systems Inc., San Jose

AxioVision Rel. 4.8 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

GraphPad Prim 5 GraphPad Software, Inc., La Jolla

Imaris V7.6 Bitplane AG, Zürich, Schweiz

ImageJ 1.46r National Institutes of Health, Bethesda

LAS AF 3 Leica Microsystems GmbH, Nussloch

Microsoft Office Excel 2007 Microsoft Corporation, Redmond, USA

Microsoft Office Word 2007 Microsoft Corporation, Redmond, USA

Gewebehacker

Mellwain™ TC 752 Stoelting Co., Dublin, Irland

Wippschüttler

Edmund Bühler WS5 Edmund Bühler GmbH, Hechingen

MagnetrührerIKAMG[®]RCTIKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

MRHei-Mix L

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG

VortexerVortex-Genie[®] 2

Karl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Waagen

BA110S

Sartorius AG, Göttingen

LC4800P

Sartorius AG, Göttingen

TE6101

Sartorius AG, Göttingen

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5417R, kühlbar

Eppendorf AG, Hamburg

Tischzentrifuge 5415D

Eppendorf AG, Hamburg

Optima[™] L-70 Ultrazentrifuge

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

mit Rotor SW 32.1 Ti

VerbrauchsmaterialienAssistent Pasteurpipetten, lange Form
230 mmGlaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG,
SondheimCellstar[®] 24-well-Zellkulturplatte

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Deckgläschen

Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

(24x50 mm und 24x60 mm)

Einweg-Pasteurpipetten, graduert

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Eppendorf Safe-Lock[™] Gefäße

Eppendorf AG, Hamburg

(1,5 ml; 2 ml)

Falcon-Gefäße

Grale HDS, Melbourne

(15 ml und 50 ml)

Objektträger

Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig

Pipettenspitzen

STARLAB GmbH, Altenburg

(0,5-20 µl)

Pipettenspitzen

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

(2-200 µl und 100-1000 µl)

6.2 Methoden

6.2.1 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten muriner Gehirne

6.2.1.1 Transkardiale Perfusionsfixierung und Präparation muriner Gehirne

Sieben wildtypische und sechs Cobl-ko-Mäuse wurden zunächst durch CO₂-Inhalation getötet. Nach Entnahme einer Schwanzspitzenbiopsie zur Genotypisierung wurden zur Freilegung des Herzens Fell und Bauchfell medial eröffnet, der Rippenbogen parasternal abgetrennt und anschließend das Zwerchfell durchtrennt. Dadurch erfolgte die Darstellung des Herzens. Daran anschließend wurde die linke Herzkammer punktiert und der rechte Vorhof eröffnet. Durch die Platzierung einer Sonde im linken Ventrikel erfolgte die Perfusion des murinen Organismus unter Zuhilfenahme einer Schlauchpumpe mit 37 °C warmem PBS für 2 bis 3 min. Dies erfolgte bis zum Austreten klarer Flüssigkeit aus dem eröffneten rechten Vorhof. Im Anschluss wurde das Gewebe für ca. 8 min mit 50-100 ml 4 % (v/v) PFA in PBS perfundiert. Die Lösung wurde zuvor auf 37 °C erwärmt. Nach Überprüfung der erfolgreichen Fixierung durch Testung der Nackensteifigkeit wurde der Kopf abgetrennt und das Gehirn entnommen. Dabei wurde die Schädeldecke medial, unter Schonung der Hirnsubstanz eröffnet und das Gehirn stumpf von der Schädelbasis gelöst. Die Nachfixierung des Organs erfolgte in 4 % PFA in PBS über Nacht bei 4 °C. Anschließend folgte die Inkubation in 10 % Saccharose in PBS bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Gehirne nach deren Absinken innerhalb der 10 %igen Saccharose-Lösung in 30 %ige Saccharose-Lösung (w/v) überführt und dort für zwei Tage belassen. So konnte eine Kryoprotektion der fixierten Gewebe gewährleistet werden.

6.2.1.2 Anfertigung von Gehirnschnitten am Schlittenmikrotom und Immunfluoreszenz-Färbung

Die Anfertigung von 40 µm dicken koronalen Gehirnschnitten erfolgte am Schlittenmikrotom. Nach Entfernung des Kleinhirns und der Riechkolben wurden die fixierten Gehirne unter Verwendung 5 %iger Saccharose-Lösung (w/v) in PBS vertikal auf den durch Trockeneis gekühlten Objektisch aufgeklebt. Das Schneiden der Gehirne erfolgte nach dem Durchfrieren der Gewebe. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Pinsel aufgenommen und in mit je 500 µl Anti-*Freezing*-Lösung gefüllte 24-well-Platten überführt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20 °C.

Zur Durchführung der Immunfärbung wurden je zwei Gewebeschnitte pro Vertiefung in 24-well-Platten mit je 500 µl Phosphatpuffer 2 pro Well überführt und dreimal 10 min mit

Phosphatpuffer 2 gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit jeweils 300 µl Blockierlösung 1 für eine Stunde bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren und die Zellmembran zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Schnitte in 250 µl Blockierlösung 1, versetzt mit den primären Antikörpern in entsprechender Verdünnung, inkubiert. Zur Markierung bestimmter Neokortexschichten wurden hierzu anti-Cux1 (markiert die Schichten II-IV) und anti-SatB2 (markiert die Schichten II, III und V) verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 48 Stunden. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen der Schnitte mit Phosphatpuffer 2 für jeweils 10 min. Nachfolgend wurden die Schnitte mit jeweils 400 µl Blockierlösung 1 mit den entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zum Anfärben der Zellkerne wurde der Lösung DAPI (1:1000) zugesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Hirnschnitte erneut dreimal mit Phosphatpuffer 2 gespült. Nach Überführen der gefärbten Schnitte in eine Schale mit PBS wurden diese unter Verwendung eines Pinsels auf Objektträger aufgezogen und anschließend mit Fluoromount-GTM eingedeckt.

Zur Färbung der Gehirnschnitte mittels anti-EAAC1 wurde, aufgrund von Interferenzen des aus einer Ziege stammenden Antikörpers mit dem Ziegennormalserum der Blockierlösung 1, von dem bestehenden Protokoll abgewichen und stattdessen Blockierlösung 2 verwendet. Weiterhin wurden die entsprechenden Schnitte mit PBS anstatt mit Phosphatpuffer 2 gewaschen und ein weiterer Blockierungsschritt vor der Zugabe des sekundären Antikörpers durchgeführt. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in 1 % (v/v) bovinem Serumalbumin in PBS verdünnt eingesetzt. Diese Änderungen erfolgten aufgrund einer empirisch ermittelten Verbesserung der Färbequalität.

6.2.1.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop TCS SP5 mithilfe der Objektive HC PL FLUOTAR 10x (0,3 NA, DRY) sowie HCX PLAPO CS 20x (0,70 NA, DRY; UV) als z-Serien. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 100 Hz bei einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln. Die z-Ebenendicke wurde auf 5 µm bei Verwendung des 10x-Objektives und auf 1 µm bei Verwendung des 20x-Objektives festgesetzt. Die Anzahl der Ebenen variierte entsprechend der exakten Dicke der einzelnen Schnitte, zwischen 8 bis 18 Ebenen bei 10facher Vergrößerung und 15 bis 40 Ebenen bei 20facher Vergrößerung. Es wurden der DPSS 561-Laser mit 35 % Laserstärke für eine Anregung bei 568 nm (Emission des Farbstoffes bei 610-700 nm bzw. 580-630 nm bei zusätzlicher Detektion im infraroten Bereich), 20 % des Argon-Lasers mit einer Laserstärke von 30 % für eine Anregung bei

488 nm (Emission des Farbstoffes bei 500-550 nm), der HeNe 633-Laser mit 33 % Laserstärke für eine Anregung bei 647 nm (Emission des Farbstoffes bei 660-750 nm) und der 405 Dioden-Laser mit einer Laserstärke von 20 % für eine Anregung bei 405 nm (Emission des Farbstoffes bei 430-470 nm) verwendet. Der Hintergrund wurde nicht bearbeitet (*Offset*: 0). Das Mikroskop verfügte über die LAS AF 3-Software von Leica. Schnitte von wildtypischen und von Cobl-ko-Tieren wurden hinsichtlich der Signalstärke unter denselben Bedingungen aufgenommen.

6.2.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung der ImageJ-Software und Bildbearbeitung

Um vergleichbare Hirnregionen auswerten zu können, wurden die Gehirnschnitte aller Tiere in jeweils drei Gruppen unterteilt. Die Zuordnung erfolgte während des Schneidens der Gewebe anhand spezifischer, makroskopisch sichtbarer Landmarken und umfasste das gesamte Gehirn nach Abtrennen der Riechkoben und des Kleinhirns. Der frontale Bereich erstreckte sich von Bregma 2,5 bis 1,5 und wurde durch das Fehlen von Ventrikeln und dem Hippocampus charakterisiert. Der mediale Bereich umfasste die Seitenventrikel bis zum Beginn des Hippocampus. Dieser Bereich entsprach in etwa Bregma 1,5 bis -1. Der okzipitale Bereich wurde durch das Erscheinen des Hippocampus definiert und umfasste etwa Bregma -1 bis Bregma -4. Die Angaben nach Bregma unterlagen interindividuellen Schwankungen. Aus diesem Grund wurden sie nur als Richtwerte verwendet (Paxinos und Franklin 2003). Ausschlaggebend für die Zuordnung zu einem Abschnitt waren das Erscheinen der Ventrikel und des Hippocampus.

Zur Bestimmung der Kernflächen und Schichtenausdehnungen wurden maximale Intensitätsprojektionen verwendet. Helligkeit und Kontrast der 8-bit-Bilder wurden manuell optimiert und die Bilder nachfolgend im tif-Format (RGB) gespeichert.

Zur Analyse der Schichtenausdehnung wurde jeweils die gesamte Neokortexdicke, die durch anti-Cux1-Markierung definierte Dicke der Schichten II-IV sowie die durch DAPI-Färbung erkennbare Ausdehnung der Schicht I bestimmt. Anschließend wurde die Dicke der Schichten V und VI durch Subtraktion der Neokortexschichten I und II-IV von der gesamten Neokortexdicke ermittelt. Die Abgrenzung des Neokortex hinsichtlich der weißen Substanz erfolgte mithilfe der anti-SatB2-Färbung. Die Längenmessungen erfolgten durch parallele Linien orthogonal zur Piaoberfläche anhand der maximalen Intensitätsprojektionen. Die ermittelten Werte wurden jeweils als Prozente der gesamten Neokortexdicke dargestellt. Im frontalen Neokortexabschnitt konnte in der Immunfluoreszenzmarkierung mit anti-Cux1 und

DAPI zwischen dem motorischen und dem sensorischen Neokortex differenziert werden, da die Schichten II-IV im motorischen Neokortex charakteristischerweise schmaler sind als im sensorischen Neokortexbereich (Abb. 7B). Die Aufnahmen, die motorische Kortexareale abbildeten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Im medialen Abschnitt befand sich ausschließlich der sensorische Neokortex im analysierten Bereich. Okzipital aufgenommene Bilder umfassten sensorische, auditive und visuelle Areale sowie Bereiche des posterioren parietalen Assoziationskortex. Über alle drei analysierten Bereiche hinweg umfasste somit der sensorische Neokortex einen Großteil des untersuchten Bereichs.

Die Auswertung der Kernfläche als Anteil an der gesamten ausgewerteten Fläche erfolgte anhand DAPI-gefärbter Bilder mithilfe der ImageJ-Software. Die Fläche der Zellkerne, die Größe der analysierten Fläche sowie der Kernflächenanteil wurden jeweils nach automatischer Grenzwertsetzung von der Software berechnet.

6.2.1.5 Statistik zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Die Analyse der laminaren Organisation des murinen Neokortex erfolgte mithilfe von Microsoft Office Excel 2007. Insgesamt wurden 35 frontale, 41 mediale und 42 okzipitale Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren sowie 27 frontale, 36 mediale und 33 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen zur Analyse der laminaren Organisation vermessen. Die Untersuchung der Kernfläche erfolgte an 20 frontalen, 28 medialen und 28 okzipitalen Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren sowie 17 frontalen, 24 medialen und 21 okzipitalen Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen. Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test überprüft. Alle Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Wurden aus technischen Gründen nicht alle zur Verfügung stehenden Bilder in die Analyse einbezogen, ist dies in den jeweiligen Abbildungen gekennzeichnet. Statistische Signifikanz wurde in der Arbeit wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Die Daten wurden, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM angegeben und grafisch dargestellt.

6.2.2 Neuronenfärbung nach Camillo Golgi

6.2.2.1 Präparation und Imprägnierung des unfixierten murinen Gehirns

Die von Glaser und Van der Loos 1981 modifizierte Golgi-Färbung wurde an unfixierten Gehirnen 17-19 Wochen alter männlicher Mäuse durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei wildtypische sowie drei Cobl-ko-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Ein Perfusionsschritt erfolgte nicht. Zur Überprüfung des Genotyps wurde eine

Schwanzspitzenbiopsie entnommen. Die Präparation der murinen Gehirne erfolgte analog zu den fixierten Hirnen durch stumpfes Abpräparieren der Schädelkalotten. Zur Färbung der Neurone wurde der FD Rapid GolgiStain™ Kit verwendet. Dazu wurden die entnommenen Gehirne jeweils in ein mit 2,5 ml Imprägnierungslösung gefülltes 50 ml Falcon-Gefäß transferiert. Darin inkubierten die Gewebe lichtgeschützt über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel der Imprägnierungslösung. Nach 20 weiteren Tagen in Dunkelheit wurden die Organe in Lösung C überführt. Am folgenden Tag erfolgte eine Erneuerung der Lösung. Nach weiteren 5 Tagen Lagerung in Lösung C bei RT in Dunkelheit konnten die Gehirne zur Lagerung bei -80 °C eingefroren werden. Hierzu wurden die Gewebe langsam in durch Trockeneis gekühltes Isopentan getaucht und anschließend für 2 min auf Trockeneis durchgefroren. Die Details der Färbeprozedur sind den Herstellerangaben des Golgi-Kit-Systems zu entnehmen.

6.2.2.2 Gelatinebeschichtung von Objektträgern

Zur besseren Haftung der Golgi-gefärbten Gehirnschnitte an den Objektträgern wurden diese zuvor mit Gelatine beschichtet. Hierzu wurden die Objektträger zweimal in Seifenwasser gewaschen, anschließend in 70 % (v/v) Ethanol getaucht und in staubfreier Umgebung über Nacht getrocknet. Die Gelatinebeschichtung erfolgte durch Einbringen der Objektträger in 60 °C heiße Beschichtungslösung. Nach Trocknung der Beschichtung bei RT für 48 Stunden erfolgte die Lagerung der Objektträger staubfrei bei RT in Dunkelheit.

6.2.2.3 Anfertigung von Gehirnschnitten am Kryostat und Golgi-Färbung einzelner Neurone

Die Anfertigung von 50 µm dicken Gehirnschnitten erfolgte am Leica CM 3050S Kryostat. Zum Schneiden wurden die eingefrorenen Gehirne zunächst mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound am Trägertisch fixiert und anschließend ungefähr 1 Stunde im Kryostat belassen. So konnte sich die Temperatur der Gewebe an die Kühltemperatur von -30 °C angleichen. Die Gewebeschnitte wurden anschließend gemäß Herstellerangaben mittels Lösung C auf die gelatinebeschichteten Objektträger aufgezogen und bei RT getrocknet.

Alternativ zum Fixieren der Gehirne mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf dem Trägertisch wurde eine Einbettung der Gewebe in Agarose getestet. Hierzu wurden die gefrorenen Gehirne in Plastikkammern mithilfe von 37 °C warmer, 2 %iger Agarose (w/v) in bidestilliertem Wasser eingebettet und auf Trockeneis durchgefroren. Das Schneiden erfolgte

anschließend im durch Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound am Trägertisch fixierten Agaroseblock.

Die Färbung der Schnitte erfolgte innerhalb von 3 Tagen nach dem Schneiden in 400 ml-Glasküvetten. Dazu wurden die Objektträger zunächst zweimal für je 2 min in bidestilliertes Wasser getaucht. Anschließend erfolgte die Überführung in die Färbelösung. Die Einwirkungszeit der Lösungen betrug jeweils 1 min. Nachfolgend wurden zwei weitere Waschschrte in bidestilliertem Wasser zu je 4 min durchgeführt. Daraufhin erfolgte der Wasserentzug durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 75 %, 95 %, 4x mal 99 % (v/v) für jeweils 4 min). Zum Schluss wurden die Objektträger dreimal für je 4 min in Xylol transferiert und anschließend mithilfe von Roti®-Histokitt II eingebettet. Die Lagerung erfolgte bei RT in Dunkelheit.

Es erfolgte eine Testung verschiedener Parameter (Einwirkzeit der Imprägnierungslösung, Einwirkzeit der Färbelösung sowie die Schnittdicke) hinsichtlich der resultierenden Dichte gefärbter Neurone.

6.2.2.4 Durchlichtmikroskopie

Die Mikroskopie der mittels Golgi-Technik gefärbten Neurone erfolgte im Hellfeld am Axio Observer.Z1 mithilfe der AxionVision-Software (Objektiv: EC PlnN 20x/0,5 DICII). Die Aufnahmen erfolgten als z-Stapelbilder mit z-Ebenendicken von 1,5 µm. So konnte die räumliche Ausdehnung des Dendritenbaumes erfasst werden.

6.2.2.5 Auswertung Golgi-gefärbter Neurone unter Verwendung der Imaris V7.6-Software

Die Auswertung der Nervenzellen in Schicht III und V erfolgte an invertierten Aufnahmen von 50 µm Koronalschnitten mithilfe der Imaris-Software (Version V7.6; Bitplane) im *Filament Tracer*-Modus und unter Verwendung des *shortest distance*-Algorithmus. Dabei wurden zunächst eine *Baseline Substraction* und eine *Background Substraction* zur Reduzierung des Hintergrundes durchgeführt. Bei der Auswertung der Pyramidenzellen der Schicht V wurden Dendriten innerhalb eines Durchmessers von 1 bis 16 µm vom Programm als Dendriten erkannt und in die Analyse einbezogen (in Abgrenzung zu *Spines* und dem Hintergrund). Das, nicht mit *Spines* besetzte, Axon wurde (falls detektiert) manuell entfernt. Unterbrochene Segmente erkannte das Programm bis zu einem Abstand von 2 µm als zusammengehörig. Fehlerhaft geknüpfte Verbindungen wurden anschließend manuell gelöscht beziehungsweise neu geknüpft. So konnte eine 3D-Rekonstruktion des

Dendritenbaumes erzeugt werden. Zur Auswertung der Neurone der Schicht III mussten die Einstellungen angepasst werden, da der Hintergrund in den oberflächennahen Neokortexschichten stärker war. Der kleinste Durchmesser zur Detektion von Dendriten wurde so auf 2 μm erhöht. Dendritenabschnitte wurden nur noch bis zu einem Abstand von 1 μm als zusammengehörig betrachtet.

Die Auswertung mithilfe der Imaris V7.6-Software folgte einer spezifischen Terminologie. Der Mittelpunkt des Zellkörpers entsprach dem Startpunkt. Die von Zellkörper abgehenden Dendriten wurden als Dendriten erster Ordnung bezeichnet. Der Punkt, einschließlich des Startpunktes, an dem sich ein Dendrit teilte, wurde als Verzweigungspunkt definiert. Auch der Startpunkt war ein Verzweigungspunkt. Der Dendrit endete an einem Endpunkt. Der Abschnitt zwischen zwei Verzweigungspunkten oder zwischen einem Verzweigungspunkt und einem Endpunkt entsprach einem Segment. Der Verzweigungswinkel wurde durch die verlängerte Achse des Ursprungssegments und den von diesem Segment abgehenden Dendriten eingeschlossen. Da die Dendriten erster Ordnung vom Startpunkt und nicht von einem anderen Segment abgingen wurde ihnen ein Winkel von 0° zugeschrieben. Dendriten erster Ordnung wurden nicht in die Analyse des Verzweigungswinkels einbezogen. Nach jedem Verzweigungspunkt behielt der Dendrit mit dem größeren Durchmesser die vorbestehende Ordnung bei, während die Ordnung des dünneren Dendriten um eins anstieg. War der Durchmesser beider Dendriten nach einem Verzweigungspunkt gleich groß, stieg nur die Ordnung des Dendriten mit dem größeren Verzweigungswinkel. Die Verzweigungstiefe stieg beginnend vom Startpunkt nach jedem Verzweigungspunkt um eins an. Die Filamentlänge entsprach der kompletten Länge aller Dendriten einer rekonstruierten Zelle beginnend vom Startpunkt.

Zur globalen Beschreibung des Verzweigungsgrades der Pyramidenzellen wurde eine Scholl-Analyse durchgeführt. Bei diesem von D. A. Sholl etablierten Verfahren (Sholl 1953) wurde die Anzahl der Schnittpunkte der Nervenzellfortsätze mit konzentrischen Ringen gemessen, deren Durchmesser ausgehend vom Startpunkt um einen definierten Wert anwuchs. Die Imaris V7.6-Software verwendete hierfür einen Wert von 5 μm . Um den ca. 10 μm großen Radius des Zellkörpers auszuschließen, wurde die Scholl-Analyse erst in einem Abstand von 10 μm vom Startpunkt begonnen und endete so weit in der Peripherie des Dendritenbaumes, wie der Gewebeerhalt dies zuließ. Die Endverzweigungen des Apikaldendriten konnten meist nicht in die Analyse einbezogen werden, da der Abstand vom Zellkörper sehr groß war und die Zellen meist nicht in ihrer kompletten Ausdehnung erhalten

waren. Die Golgi-Technik erlaubte eine Differenzierung der Schichten des Neokortex anhand der laminaren Anordnung der gefärbten Neurone. Eine Differenzierung zwischen motorischen und sensorischen Kortexarealen war hier allerdings nicht möglich.

6.2.2.6 Statistik zur Auswertung der Golgi-Färbung

Die statistische Analyse der mit der Imaris V7.6-Software erhobenen Daten erfolgte mithilfe von Microsoft Office Excel 2007 und IBM SPSS Statistics 22. Unterschiede im Kurvenverlauf wurden durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen mithilfe von IBM SPSS Statistics 22 als Zwischensubjekteffekt durch paarweisen Vergleich von wt und Cobl-ko nachgewiesen. Die mittlere Schnittpunktzahl jedes Ringes wurde zusätzlich zwischen den Genotypen mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test analysiert. Weiterhin wurde ein Durchschnittswert für die Anzahl der Schnittpunkte pro Zelle, Ring und Genotyp gebildet und mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz hin überprüft. Es wurden zur Auswertung der Morphologie der Schicht V-Pyramidenzellen 28 Zellen von drei wildtypischen und 50 Zellen von drei Cobl-ko-Mäusen herangezogen (je 8 bis 20 Zellen pro Tier). Für die Scholl-Analyse der Schicht V-Pyramidenzellen wurden davon 26 Zellen aus wildtypischen und 49 Zellen aus Cobl-ko-Mäusen verwendet (je 8 bis 19 Zellen pro Tier). Für die morphologische Analyse der Schicht III-Pyramidenzellen wurden 32 Zellen von drei wildtypischen und 47 Zellen von drei Cobl-ko-Mäusen untersucht (je 8 bis 21 Zellen pro Tier). Die Scholl-Analyse der Schicht III-Pyramidenzellen erfolgte an 32 Zellen aus dem wt und 45 Zellen aus dem Cobl-ko (je 7 bis 20 Zellen pro Tier). Statistische Signifikanz wurde in der Arbeit durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. In den Grafiken wurden die Mittelwerte \pm dazugehöriger SEMs dargestellt.

7 Ergebnisse

7.1 Analyse der laminaren Organisation im Neokortex von Cobl-ko- Mäusen

7.1.1 Veränderungen in der Schichtenausdehnung von Cobl-ko-Mäusen

Cobl ist ein neuronal angereichertes Protein (Ahuja et al. 2007). Defekte zytoskelett-assoziiierter Proteine wurden im murinen Neokortex mit einer Veränderung der laminaren Organisation in Verbindung gebracht (Cappello et al. 2012). Aus diesem Grund sollte die Struktur der kortikalen Schichtung von Gehirnen aus Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wildtypischen Neokortex untersucht werden.

Da der Neokortex in antero-posteriorer sowie medio-lateraler Ausdehnung funktionell wie morphologisch stark arealisiert ist, wurden die Hirnschnitte entsprechend ihrer Lage einem frontalen, einem medialen bzw. einem okzipitalen Bereich zugeordnet (Abb. 6).

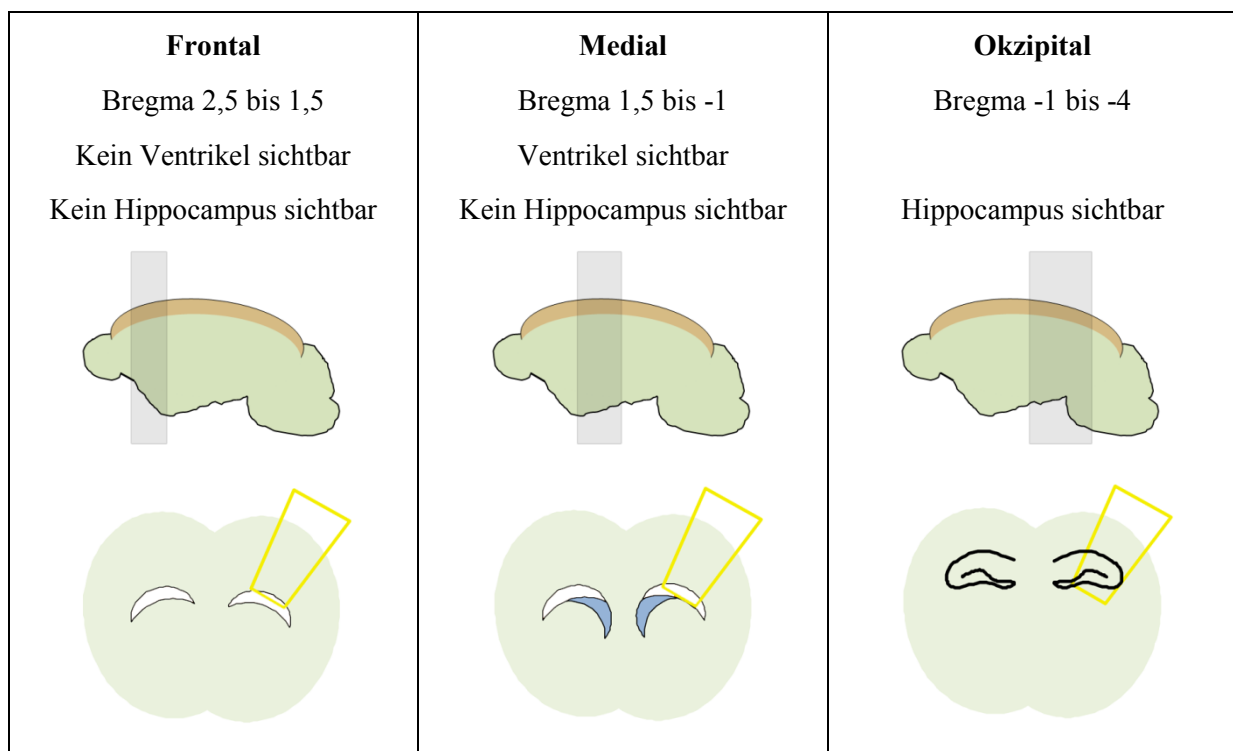


Abb. 6: Antero-posteriore und medio-laterale Klassifikation immunfluoreszenzmarkierter Hirnschnitte. Anhand charakteristischer morphologischer Kriterien wie der weißen Substanz, der Zentralfurche und dem Hippocampus erfolgte die Eingruppierung der Hirnschnitte in frontale, mediale bzw. okzipitale Regionen (grau hinterlegt). Die Angaben nach Bregma sind Richtwerte und unterliegen den interindividuellen Schwankungen bezüglich der Morphologie. Ausschlaggebend für die Definition sind die in der unteren Bildhälfte an schematischen Koronalschnitten dargestellten morphologischen Kriterien, wie die weiße Substanz (weiße Halbmonde) sowie die Sichtbarkeit der Ventrikel (blaue Halbmonde) und des Hippocampus (schwarze Linie). Die für die Analyse der Kortexschichtung verwendeten Bilder entsprechen den dargestellten Ausschnitten (untere Bildreihe, gelbes Trapez).

Nach der Einteilung der Hirnschnitte in die drei in Abbildung 6 genannten Kategorien wurde zunächst eine Übersicht über die Schichtenausdehnung des wildtypischen murinen Neokortex von frontal nach okzipital erstellt. Hierfür wurde durch Immunfluoreszenz-markierung der Schichten II-IV mithilfe von anti-Cux1 die relative Ausdehnung dieser Schichten ermittelt. Die Quantifizierung der Schicht I konnte durch die Vermessung des Bereiches zwischen der *Pia mater* und der Obergrenze des anti-Cux1-positiven Bereichs erfolgen. Die Immunfluoreszenzfärbung des Neokortex mit anti-SatB2 erlaubte entgegen der in Cappello et al. (2012) beschriebenen Markierung keine eindeutige Markierung der Schichten II/III und V, da auch vereinzelt Pyramidenzellen anderer kortikaler Schichten SatB2-positiv waren. Allerdings konnte mittels anti-SatB2 eine eindeutige Abgrenzung des Neokortex zur weißen Substanz hin erfolgen, was für die exakte quantitative Analyse der laminaren Organisation wichtig war. Die Dicke der Schichten V und VI zusammen konnte durch Subtraktion der Schichten I-IV von der gesamten Neokortexdicke ermittelt werden. Eine Differenzierung zwischen Schicht V und Schicht VI war jedoch genauso wie eine scharfe radiäre Abgrenzung der Schichten II und IV von der Schicht III auf diese Weise nicht möglich (Abb. 7A).

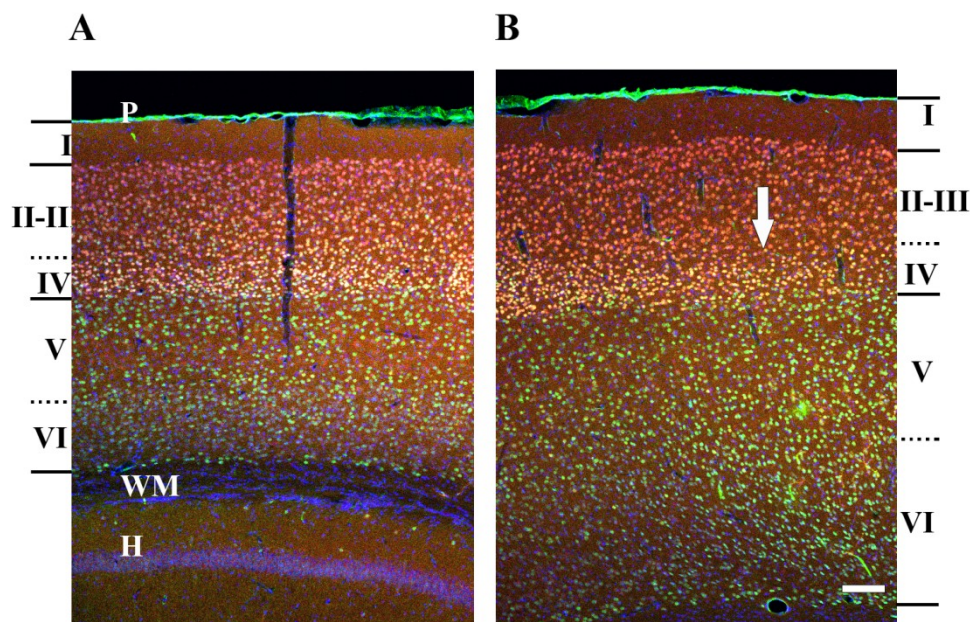


Abb. 7: Bestimmung der laminaren Organisation des Neokortex anhand immunfluoreszenzmarkierter Gehirnschnitte. Die Abbildung zeigt 40 µm dicke Koronalschnitte des murinen Neokortex. Die Schichten II-IV sind durch anti-Cux1 markiert (rot), die anti-SatB2-Färbung (grün) erlaubt die Abgrenzung des Neokortex zur weißen Substanz. Die römischen Zahlen entsprechen den Neokortexschichten. **(A)** Dargestellt ist ein Hirnschnitt im okzipitalen Kortex einer wildtypischen Maus. **(B)** Dargestellt ist der Übergang vom sensorischen (links) zum motorischen Neokortex (rechts) in einem frontalen Hirnschnitt einer wildtypischen Maus. Die Abgrenzung zum motorischen Neokortex ist durch den Verlust der in der DAPI und anti-Cux1-Färbung als zeldichtes Band erscheinenden Schicht IV (weißer Pfeil) möglich. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. WM: *white matter* (weiße Substanz); H: Hippocampus; P: *Pia mater* (weiche Hirnhaut).

Zur Vermeidung einer Verfälschung der Ergebnisse durch die differierende laminare Organisation des motorischen und des sensorischen Neokortex wurden motorische Kortexareale von der Analyse der laminaren Organisation des Neokortex nach Immunfluoreszenzfärbung ausgeschlossen (Abb. 7B).

Anhand der Mittelwerte der frontalen ($n = 35$; 4-6 Schnitte pro Tier), medialen ($n = 41$; 5-6 Schnitte pro Tier) und okzipitalen ($n = 42$; 6 Schnitte pro Tier) Hirnschnitte von sieben wildtypischen Mäusen wurde eine Übersicht über die Ausdehnung der Neokortexschichten in Abhängigkeit von ihrer antero-posterioren Lokalisation erstellt (Abb. 8A).

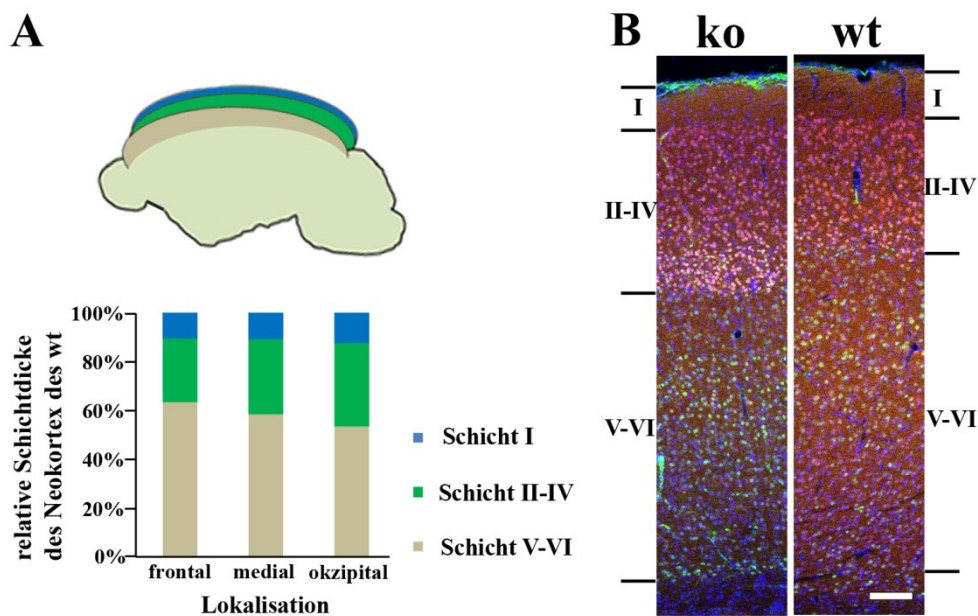


Abb. 8: Laminare Organisation des murinen Neokortex. (A) Dargestellt ist der antero-posteriore Verlauf der Schichtenausdehnung des wildtypischen murinen Neokortex. Es sind die Mittelwerte \pm dazugehörigen SEMs unter 11.3.1 aufgelistet. Die Grafik basiert auf der Auswertung immunfluoreszenzgefärbter (anti-Cux1, anti-SatB2 und DAPI) 40 µm dicker Koronalschnitte. Die Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Oberhalb der Grafik befindet sich ein schematischer Sagittalschnitt durch ein wildtypisches Mausgehirn zur Verdeutlichung der veränderten Schichtenausdehnung im antero-posterioren Verlauf. **Blau:** Schicht I, **Grün:** Schichten II-IV, **Beige:** Schichten V-VI (Darstellung nicht maßstabgetreu). (B) Die Abbildung zeigt 40 µm dicke Koronalschnitte des medialen Neokortex einer Cobl-ko-Maus (links) und einer wildtypischen Maus (rechts) im Vergleich. Die Schichten II-IV sind durch anti-Cux1 (rot), DAPI (blau) und anti-SatB2-Färbung (grün) markiert. Die römischen Zahlen entsprechen den Neokortexschichten. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Es wurde deutlich, dass sich die Ausdehnung der Schicht I relativ zur gesamten Neokortexdicke nur geringfügig veränderte (von frontal 10,5 % des gesamten Neokortex auf 10,6 % medial und 12,4 % okzipital). Demgegenüber veränderten sich die Schichten II-IV und V-VI gegenläufig. Während die Schichten II-IV mit zunehmender posteriorer Lokalisation einen größeren Anteil einnahmen (von 26,0 % des gesamten Neokortex frontal auf 30,9 % medial und 33,9 % okzipital), wurden die Schichten V-VI schmäler (von 63,5 %

des gesamten Neokortex frontal auf 58,5 % medial und 53,7 % okzipital, Abb. 8A). Das in Abb. 8A dargestellte Schema visualisiert die Ergebnisse der Analysen.

In nachfolgenden Analysen wurde die laminare Organisation des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen mit dem wildtypischen Neokortex verglichen. Die Abbildung 8B zeigt beispielhaft Hirnschnitte beider Genotypen im Vergleich (medialer Neokortex).

Zunächst wurden die absoluten Werte der gesamten Neokortexdicken im Vergleich der Genotypen analysiert. Hierbei konnte über alle Neokortexbereiche hinweg kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ausdehnung des gesamten Neokortex gefunden werden (frontal: 1,36 mm bei Cobl-ko-Mäusen und 1,46 mm im wt, $p = 0,1$; medial: 1,38 mm bei Cobl-ko-Mäusen und 1,42 mm beim wt, $p = 0,5$; okzipital: 1,06 mm bei Cobl-ko-Mäusen und 1,10 mm im wt, $p = 0,6$). Dabei war allerdings eine nicht signifikante Tendenz zu einer geringeren Neokortexdicke bei Cobl-ko-Mäusen zu beobachten. Die Abbildung 9A veranschaulicht die Ergebnisse der Analyse.

Nachfolgend wurde eine Gegenüberstellung der relativen und absoluten Ausdehnungen der einzelnen Neokortexschichten durchgeführt. Die relative sowie die absolute Ausdehnung der Schicht I blieb dabei über die gesamte antero-posteriore Ausdehnung des Neokortex hinweg weitgehend unverändert und unterschied sich auch nicht signifikant zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen (Abb. 9B, IA). Die statistischen Daten sind in Kapitel 11.3.1 aufgeführt.

Der prozentuale Anteil der Schichten II-IV am gesamten Neokortex war bei Cobl-ko-Mäusen über alle Neokortexbereiche hinweg signifikant größer als im wt (Abb. 9C). Der stärkste Effekt zeigte sich hierbei im frontalen Bereich. Hier vergrößerte sich die Schichtdicke um 6,4 % des gesamten Neokortex (von 26,0 % im wt auf 32,4 % bei Cobl-ko-Mäusen). Dies entsprach einer relativen signifikanten Vergrößerung um 24,6 % gegenüber dem wt ($p = 1,1 \times 10^{-6}$). Auch in der Analyse der absoluten Dicken der Schicht II-IV fanden sich im Vergleich der Genotypen im frontalen Bereich signifikante Unterschiede ($p = 0,03$). In okzipitaler Richtung waren die Effekte weiterhin signifikant, aber etwas weniger deutlich ausgeprägt. Im medialen Bereich vergrößerte sich die Dicke der Schichten II-IV signifikant um 3,7 % bezogen auf die Gesamtneokortexdicke, was einer Vergrößerung von 12 % bezogen auf den wt entsprach (von 30,9 % im wt auf 34,6 % bei Cobl-ko-Mäusen; $p = 0,0009$). Im okzipitalen Bereich entsprach der signifikante Zuwachs 1,9 % des gesamten Neokortex (von 33,9 % im wt auf 35,8 % bei Cobl-ko-Mäusen; $p = 0,004$).

Weiterhin wurde die Ausdehnung der Schichten V-VI bei Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wildtypischen Neokortex betrachtet (Abb. 9D). Die relative sowie die absolute Dicke der

Schichten V-VI verringerten sich bei Cobl-ko-Mäusen gegenüber dem Neokortex wildtypischer Mäuse. Der stärkste Effekt fand sich auch hier im frontalen Bereich. Es unterschieden sich wildtypischer und Cobl-ko-Neokortex frontal signifikant um 6,9 % (63,5 % in wildtypischen und 56,6 % in Cobl-ko-Mäusen; $p = 2,6 \times 10^{-6}$). Dies entsprach einer relativen Reduktion der Schichtdicke um 10,9 % gegenüber dem wt. Auch hinsichtlich des Vergleichs der absoluten Schichtdicken zeigten sich im frontalen Bereich signifikante Unterschiede ($p = 0,002$). Im medialen Bereich fand sich eine Differenz von 3,2 % zwischen den Dicken der Schichten V-VI im Neokortex wildtypischer Mäuse gegenüber Cobl-ko-Mäusen (58,5 % in wildtypischen und 55,3 % in Cobl-ko-Mäusen; $p = 0,012$). Auch im okzipitalen Bereich verringerte sich die Ausdehnung der Schichten V-VI. Hier wurde eine Reduktion der Schichtdicke um 3 % des gesamten Neokortex statistisch signifikant nachgewiesen (53,7 % in wildtypischen und 50,7 % in Cobl-ko-Mäusen; $p = 0,012$).

Die Abbildung 9E-G visualisieren zusammenfassend die Ergebnisse der Analysen innerhalb des frontalen (Abb. 9E), medialen (Abb. 9F) und okzipitalen (Abb. 9G) Bereichs des Neokortex. Diese Gegenüberstellung verdeutlicht die unterschiedlich starke Ausprägung der Veränderungen in der laminaren Organisation des Cobl-defizienten Neokortex in den unterschiedlichen Neokortexbereichen. Die stärksten Effekte fanden sich im frontalen Abschnitt. Mit zunehmender okzipitaler Lokalisation blieben die Effekte signifikant, waren aber weniger stark ausgeprägt.

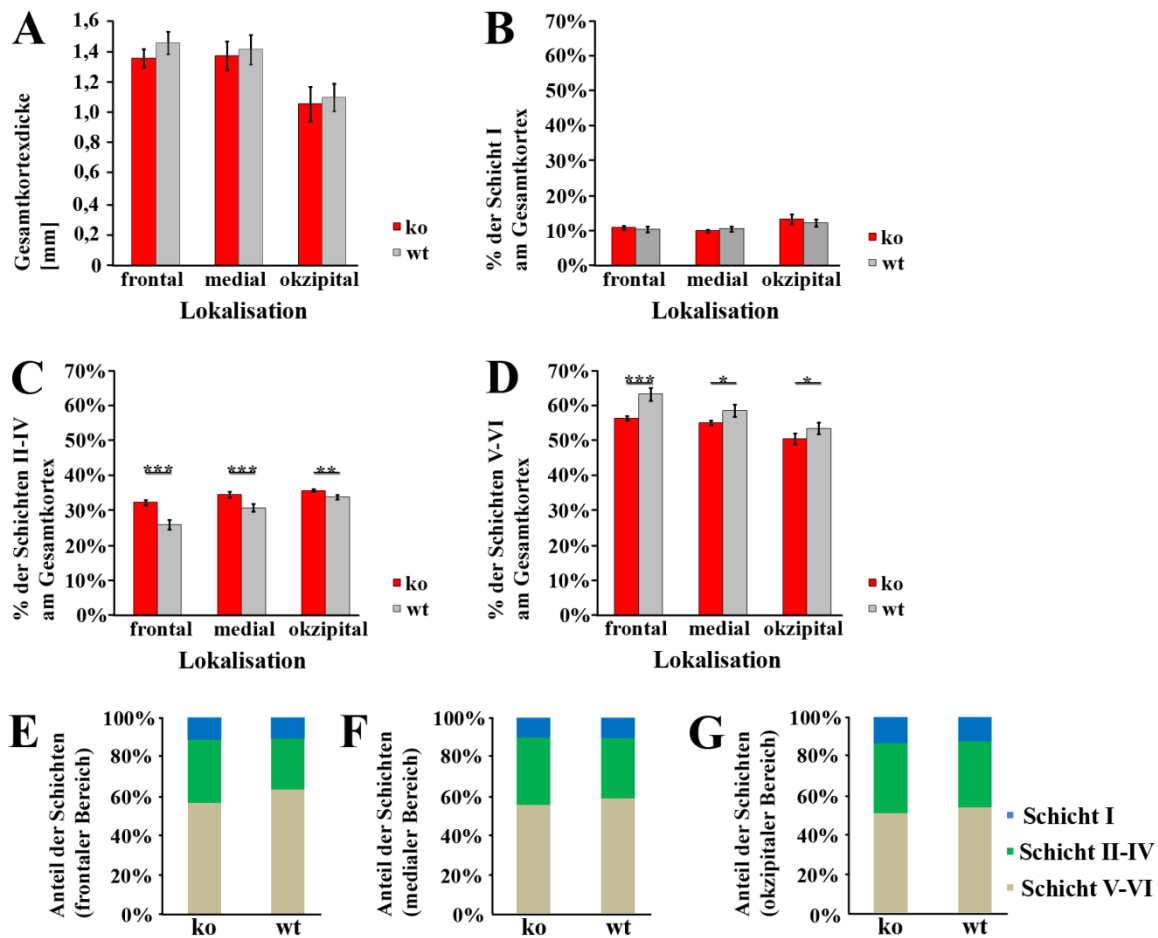


Abb. 9: Analyse der Schichtenausdehnung im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wildtypischen Neokortex. Dargestellt ist der Vergleich zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen hinsichtlich der Dicke des Gesamtkortex (**A**) sowie der relativen Ausdehnung der Schichten I (**B**), II-IV (**C**) und V-VI (**D**) in Abhängigkeit von der Lokalisation der Gehirnschnitte. (**E-G**) Übersicht über den prozentualen Anteil der einzelnen Schichten des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt im frontalen (**E**), medialen (**F**) und okzipitalen (**G**) Bereich. Die Grafik basiert auf der Auswertung immunfluoreszenz-gefärbter (anti-Cux1, anti-SatB2 und DAPI) 40 µm dicker Koronalschnitte. Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-Test* überprüft. Die Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Es wurden insgesamt 27 frontale, 36 mediale und 33 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen mit 35 frontalen, 41 medialen und 42 okzipitalen Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren verglichen. Dabei wurden jeweils vier bis sechs Schnitte von einem Tier verwendet. Statistische Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm dazugehörigen SEMs dargestellt. Die absoluten Ergebnisse der Analysen zu den Grafiken A-D einschließlich der zugehörigen SEMs können Kapitel 11.3.1 entnommen werden.

Der Vergleich beider Genotypen bezüglich der Unterschiede in den absoluten Schichtdicken (Abb. 1A-C) erbrachte aufgrund eines starken anterior-posterioren Gradienten der Neokortexdicke sowie großer interindividueller Variabilität hinsichtlich der gesamten Neokortexdicke weniger häufig signifikante Unterschiede. Die Abbildung ID im Kapitel 11.3.2 veranschaulicht diese Problematik. Die absoluten Werte waren konsistent zu den relativen Ausdehnungen der einzelnen Schichten, die Standardabweichungen der Mittelwerte waren allerdings größer. Die Ergebnisse der Analyse einschließlich der

Standartabweichungen der Mittelwerte sowie die entsprechenden Grafiken können dem Kapitel 11.3.2 entnommen werden.

7.1.2 Analyse der Kernfläche in den Schichten III, IV und V des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen

Im Anschluss an die Untersuchungen zur laminaren Organisation des Neokortex wurde die Kernfläche als Maß für die Zelldichte speziell in den Schichten III, IV und V analysiert. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob eine erhöhte bzw. reduzierte Zelldichte der veränderten Ausdehnung der Schichten II-IV und V-VI ursächlich zu Grunde lag.

Hierzu wurde ein Großteil der zur Auswertung der laminaren Organisation verwendeten Gehirnschnitte bezüglich des prozentualen Anteils der vom Zellkern eingenommenen Fläche an der gesamten ausgewerteten Fläche in distinkten Schichten untersucht (20 frontale, 28 mediale und 28 okzipitale Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren; 17 frontale, 24 mediale und 21 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen). Ausgewertet wurden spezifisch die Schichten III, IV und V, da sie als Eingangs- bzw. Ausgangsschichten peripherer sensorischer Bahnen eine wichtige Rolle im Informationsfluss des sensorischen Kortex spielen. Die direkte Analyse der Zelldichte war aufgrund von Überlappungseffekten der Zellkerne besonders in der Schicht III nur eingeschränkt möglich. Die Abbildung II im Kapitel 11.3.2 veranschaulicht diese Problematik und die Ergebnisse der Zelldichte-Analysen.

Die Differenzierung von Neokortexschichten erfolgt in der Regel deskriptiv mittels Nissl-Färbung durch Markierung der Zellkörper über Kern-nahe Strukturen wie RNA und Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Die Analysen zur Kernfläche im Rahmen dieser Arbeit wurden allerdings aufgrund der Kombinierbarkeit mit der Immunfluoreszenzfärbung nicht an Nissl-gefärbten, sondern an DAPI-markierten Gehirnschnitten vorgenommen (Abb. 10A). Die DAPI-Färbung als Kernfärbung erlaubte analog zu einer Nissl-Färbung die spezifische Zuordnung bestimmter Areale zu allen kortikalen Schichten ohne allerdings eine scharfe radiäre Abgrenzung zu benachbarten Neokortexschichten zu ermöglichen, wie es beispielsweise bei den durch anti-Cux1-Immunfluoreszenzfärbung scharf begrenzten Schichten II-IV der Fall war.

Die Schicht IV erschien in der DAPI-Färbung gut sichtbar als radiärer Bereich erhöhter Zelldichte im unteren Teil der oberen Hälfte des Neokortex (Abb. 10A). Um den Kernflächenanteil innerhalb der Schicht V klar vom Kernflächenanteil in der Schicht VI zu unterscheiden, wurde stets ein Areal direkt unterhalb der Schicht IV/V-Grenze ausgewertet,

ohne jedoch den unscharfen Überlappungsbereich der beiden kortikalen Schichten zu tangieren. Analog dazu wurde zur Ermittlung der Kernfläche in der Schicht III stets ein Areal direkt oberhalb der Schicht III/IV-Grenze gewählt, ohne dass die auszuwertende Fläche den unscharfen Überlappungsbereich zur angrenzenden kortikalen Schichten beinhaltete. So konnte auch die Schicht III in der DAPI-Färbung von der Schicht II abgegrenzt werden.

Durch diese Analysen konnten signifikante Unterschiede im Vergleich der Genotypen im medialen Bereich der kortikalen Schichten III und IV identifiziert werden. In der Schicht III wurde eine Erhöhung der Kernfläche von 18,8 % beim wt auf 22,9 % bei Cobl-ko-Mäusen mit $p = 0,03$ statistisch signifikant (Abb. 10B). Der deutlichste Unterschied bezüglich der Kernfläche ergab sich allerdings im medialen Bereich der Schicht IV. Hier konnte eine Erhöhung der Kernfläche von 33,9 % bei wildtypischen auf 40,8 % bei Cobl-ko-Mäusen mit $p = 0,0003$ detektiert werden (Abb. 10C). In den Schichten III und IV fand sich auch im frontalen und okzipitalen Bereich ein nicht signifikanter Trend hin zu einer erhöhten Kernfläche bei Cobl-ko-Mäusen gegenüber dem wt. In der Schicht V fand sich im Gegensatz dazu in keinem Kortexbereich ein signifikanter Unterschied (Abb. 10D). Alle Ergebnisse der Analyse einschließlich der zugehörigen SEMs können dem Kapitel 11.3.1 entnommen werden.

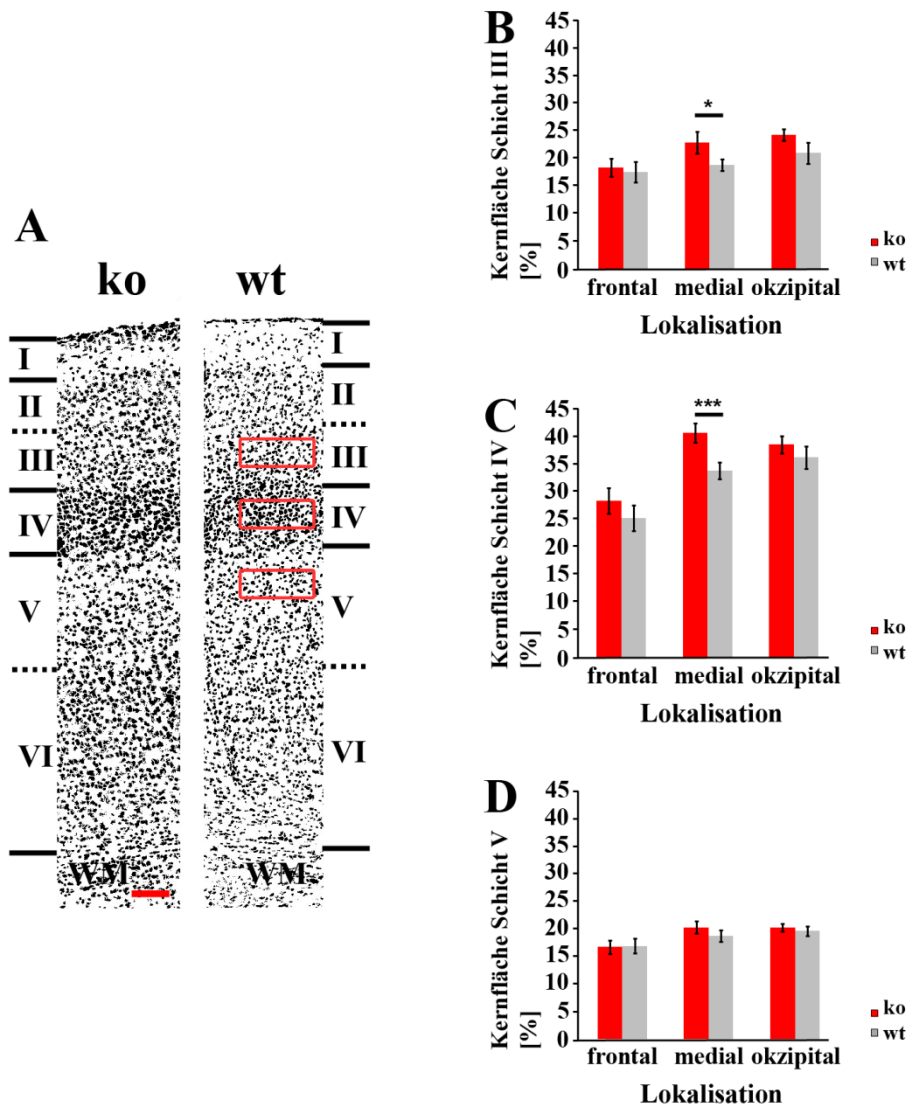


Abb. 10: Analyse der Kernfläche im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt. (A) Dargestellt sind Ausschnitte zweier DAPI-gefärbter, 40 µm dicker Gehirnschnitte einer Cobl-ko-Maus und einer wildtypischen Maus im medialen Bereich. Der Maßstabsbalken (rot) entspricht 100 µm. Die römischen Zahlen (I-VI) definieren die Schichten des Neokortex. Die roten Rechtecke veranschaulichen beispielhaft die zu quantifizierenden Regionen in den Schichten III, IV und V. WM: *white matter* (weiße Substanz) **(B-D)** Dargestellt ist der Vergleich zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen hinsichtlich der Kernfläche in den Schichten III **(B)**, IV **(C)** und V **(D)** in Abhängigkeit von der Lokalisation der Gehirnschnitte. Dabei wurden 20 frontale, 28 mediale und 28 okzipitale Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren sowie 17 frontale, 24 mediale und 21 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen ausgewertet. Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test überprüft. Die Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Statistische Signifikanz ist wie folgt dargestellt: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm dazugehörigen SEMs dargestellt.

7.2 Expressionsanalyse von Cobl im wildtypischen Neokortex

Neben den Veränderungen in den Zelldichten in distinkten kortikalen Schichten sollten Anomalitäten der Zellmorphologien innerhalb der Schichten als mögliche Ursache für die beschriebenen Phänotypen in der laminaren Organisation unter Cobl-Defizienz untersucht werden. Um Hinweise auf den von der Cobl-Defizienz wahrscheinlich betroffenen

Neuronentyp zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Kolokalisationsuntersuchungen durchgeführt. Weiterhin wurde die genaue zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Cobl-Expression im Neokortex untersucht (Abb. A-F). Hierbei wurde eine Kolokalisation der Signale von Antikörpern gegen Cobl und dem Glutamat-Transporter als Marker für Projektionsneurone (Pyramidenzellen) speziell in den Schichten II-V beobachtet (Abb. 11D). Somit konnte die Expression von Cobl in Pyramidenzellen der Schichten II-V des Neokortex gezeigt werden.

Da die Morphologie von Pyramidenzellen wesentlich durch die Komplexität ihres Dendritenbaumes bestimmt wird, wurde eine mögliche Expression von Cobl in den Dendriten von Pyramidenzellen des Neokortex untersucht. Hierzu wurden Kolokalisationsanalysen mit Antikörpern gegen Cobl sowie den Dendritenmarker MAP2 durchgeführt. Durch diese Immunfärbung konnte eine Kolokalisation beider Signale in den Dendriten der Pyramidenzellen gezeigt werden (Abb. 11E). Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigen damit eine spezifische Lokalisation von Cobl in den Dendriten und den Zellkörpern kortikaler Pyramidenzellen der Schichten II-V (Abb. 11F).

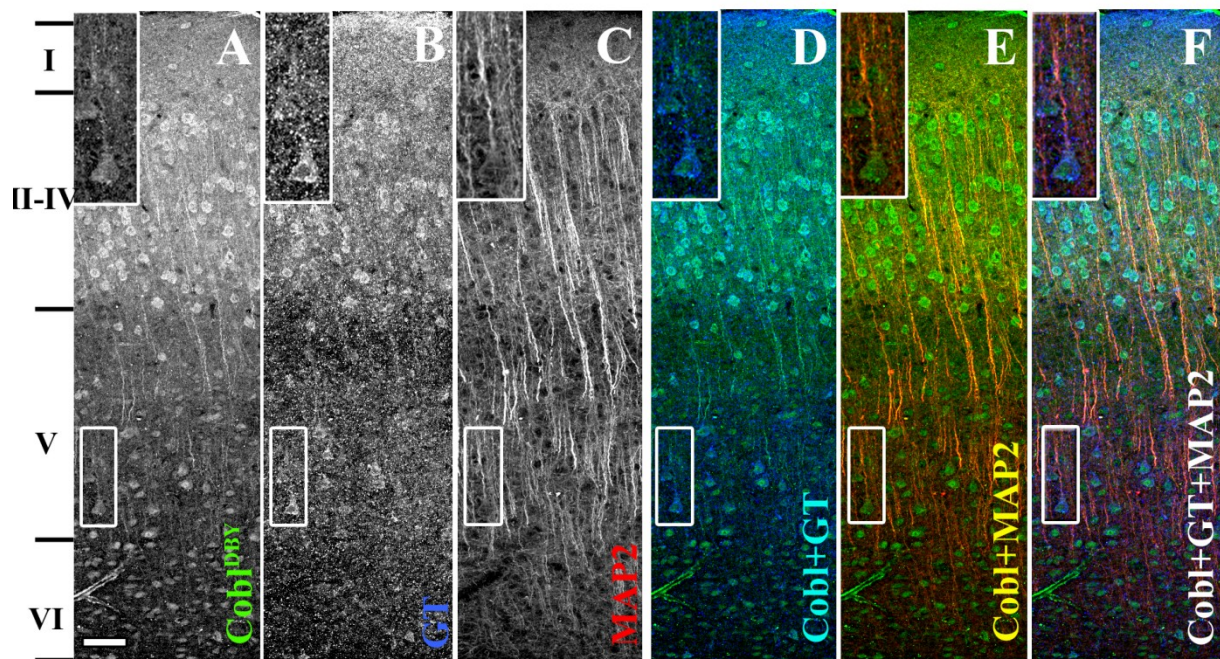


Abb. 11: Immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären und subzellulären Lokalisation von Cobl in Pyramidenzellen des Neokortex. Die immunhistochemische Färbung eines 40 µm dicken Koronalschnitts einer 15 Wochen alten wildtypischen Maus mit anti-Cobl^{DBY} (A, D, E, F, in D-F grün), anti-Glutamat-Transporter (B, D, F, in D, F blau) sowie anti-MAP2 (C, E, F, in E, F rot) zeigt eindeutig die Expression von Cobl in den Dendriten (E, gelb) kortikaler Pyramidenzellen (D, türkis). Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm. In den oberen linken Ecken ist beispielhaft eine Pyramidenzelle der Schicht V in 2facher Vergrößerung dargestellt (weiße Rechtecke). Die römischen Zahlen markieren die Schichten des Neokortex. GT: Glutamat-Transporter.

7.3 Auswirkungen der Cobl-Defizienz auf die Morphologie einzelner kortikaler Neurone *in vivo*

Die Expression von Cobl in den Dendriten kortikaler Pyramidenzellen animierte zu einer genaueren Analyse der Morphologie des Dendritenbaumes dieser distinkten Neuronenpopulation. Der Fokus der Analysen lag dabei auf Pyramidenzellen in den kortikalen Schichten, die signifikante Veränderungen in der Schichtenausdehnung im Cobl-ko-Neokortex gezeigt hatten (Schichten II-IV sowie V-VI). Pyramidenzellen finden sich dabei vor allem in den Schichten III und V des Neokortex.

Zur morphologischen Analyse neokortikaler Pyramidenzellen wurde eine Golgi-Färbung durchgeführt (Abb. 12A), wozu zunächst das bestehende Färbeprotokoll optimiert wurde. Anschließend erfolgte die globale Beschreibung der Morphologie mittels Scholl-Analyse (Abb. 12B) sowie nachfolgend die detailliertere Beschreibung einzelner Parameter. Die Auswertung der Parameter folgte einer spezifischen Terminologie (Kapitel 6.2.2.5 und Abb. 12C).

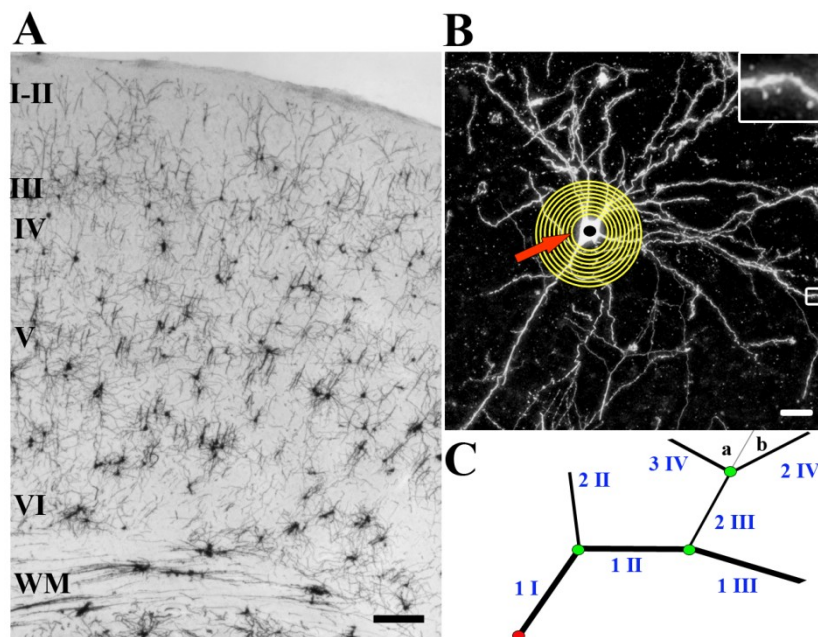


Abb. 12: Morphologische Darstellung individueller Neurone mittels Golgi-Färbung und Analyse des Verzweigungsgrades nach Scholl. (A) Die Golgi-Technik erlaubt eine Differenzierung der Schichten des Neokortex anhand der laminaren Anordnung der gefärbten Neurone. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem Golgi-gefärbten, 50 µm dicken koronalen Hirnschnitt einer 17 Wochen alten Maus. Die römischen Ziffern markieren die Schichten des Neokortex. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm. WM: *white matter* (weiße Substanz). (B) Die Abbildung zeigt die invertierte Aufnahme einer Golgi-gefärbten und mithilfe der Imaris V7.6-Software ausgewerteten Schicht V-Pyramidenzelle mit typischem dreieckigen Zellkörper (roter Pfeil) und *Spines* an den Dendriten (3fache Vergrößerung im Kasten in der rechten oberen Ecke). Pyramidenzellen stellen den vorherrschenden Neuronentyp in den Schichten III und V des Neokortex dar und konnten anhand ihrer Lokalisation und den oben genannten morphologischen Kriterien erkannt und analysiert werden. Die Abbildung veranschaulicht

zusätzlich das Verfahren der Scholl-Analyse, bei dem die Anzahl der Schnittpunkte einer Nervenzelle mit konzentrisch um ihren Zellkörper gelegten Kreisen grafisch dargestellt wird. Der erste Ring beginnt ca. an der Oberfläche des Zellkörpers in einem Abstand von 10 µm vom Startpunkt (roter Punkt). Die Ringe folgen in einem Abstand von 5 µm aufeinander. Die ersten neun Ringe sind in der Grafik beispielhaft eingezeichnet (maßstabsgerecht). Der Maßstabsbalken entspricht 25 µm. (C) Die Parameter zur Auswertung der Golgi-gefärbten Neurone mittels Imaris V7.6-Software folgen einer spezifischen Terminologie. Schwarze Strecken entsprechen Segmenten, wobei die Liniendicke den Durchmesser veranschaulichen soll. Grüne Punkte zeigen Verzweigungspunkte an. Der rote Punkt entspricht dem Startpunkt. Auch der Startpunkt ist ein Verzweigungspunkt. Arabische Zahlen entsprechen den Dendritenordnungen, römische der Verzweigungstiefe. Kleine Buchstaben zeigen die Verzweigungswinkel an, wobei a größer als b ist. Die graue Linie entspricht der Verlängerung des Segments 2 III.

7.3.1 Methodische Optimierung der Golgi-Färbung

Die Golgi-Färbetechnik war ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren zur Analyse der Morphologie individueller Neuronen. Dabei lag die benötigte Zeitspanne von der Präparation der Gehirne bis zum fertig eingedeckten Gehirnschnitt bei mindestens 29 Tagen, wobei die Einwirkzeit der Imprägnierungslösung mit 20 Tagen der zeitbestimmende Faktor war.

Technische Probleme beim Schneiden (die Gehirne waren zu weich, um sie mithilfe des *Open-Top-Kryostat* CM 3050S von Leica schneiden zu können) sowie beim Färben der Gehirnschnitte (die Schnitte lösten sich beim Färben von den Objektträgern und die Dichte der gefärbten Neurone war zu groß, um sie mithilfe der Imaris V7.6-Software auswerten zu können) führten dazu, dass die tatsächlich benötigte Tierzahl stets höher war als für das entsprechende Experiment notwendig gewesen wäre.

Aus diesen Gründen wurde vor der eigentlichen Analyse der Morphologie von Schicht III- und V-Pyramidenzellen das bestehende Protokoll zur Golgi-Färbung von Neuronen hinsichtlich Färbezeit, Dichte der gefärbten Neurone sowie Schneide- und Färbequalität optimiert.

7.3.1.1 Optimierung von Färbedauer und Dichte gefärbter Neurone bei der Golgi-Färbung

Zunächst wurde überprüft, ob die Einwirkzeit der Imprägnierungslösung Einfluss auf die Dichte gefärbter Neurone hatte, da eine Verkürzung der Einwirkzeit auch eine Beschleunigung des gesamten Färbeprozesses zur Folge hätte. Weiterhin wurde der Einfluss der Schnittdicken auf die Dichte der gefärbten Neurone analysiert.

Hierzu wurden zwei Testserien miteinander verglichen.

Serie 1 bestand aus zwei männlichen wildtypischen Mäusen, deren Gehirne für 14 Tage in der Imprägnierungslösung belassen wurden.

Serie 2 bestand aus einem weiblichen heterozygoten Tier, dessen Gehirn für 20 Tage in der Imprägnierungslösung belassen wurde.

Die Färbung der Mausgehirne wurde nach dem in Abschnitt 6.2.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Dabei wurden beide Testserien gleich behandelt. Zur Auswertung der Testserien wurden repräsentative Aufnahmen von 100 µm dicken sagittalen Schnitten in vergleichbarer Lokalisation hinsichtlich der Dichte der gefärbten Neurone verglichen (Abb. 13). Beim Schneiden der Gehirne wurden zusätzlich an beiden Testserien verschiedene Einwirkzeiten der Färbelösung sowie verschiedene Schnittdicken hinsichtlich Praktikabilität und resultierender Neuronendichte getestet.

Im Vergleich beider Testserien hinsichtlich der Zelldichte zeigte sich im optischen Erscheinen kein Unterschied zwischen einer Einwirkzeit der Imprägnierungslösung von 14 Tagen gegenüber einer Einwirkzeit von 20 Tagen. Da die Nervenzellen nach 14 Tagen in der Imprägnierungslösung allerdings weniger gleichmäßig gefärbt erschienen, wurde die Einwirkzeit der Lösung bei 20 Tagen (entsprechend den Herstellerangaben) belassen.

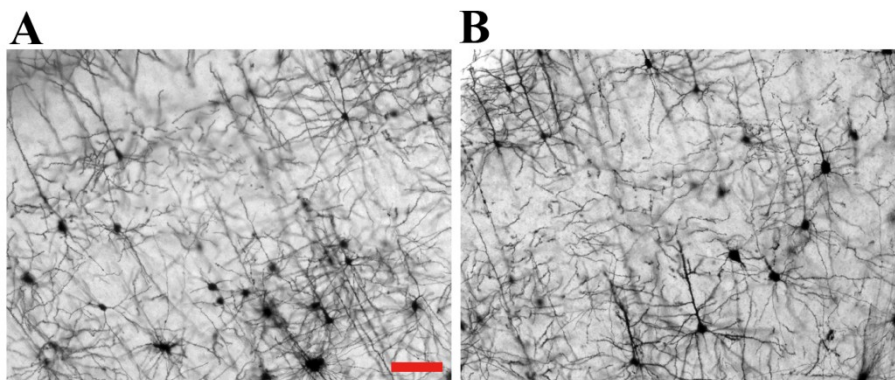


Abb. 13: Analyse des Einflusses der Einwirkzeit der Imprägnierungslösung auf die Dichte Golgi-gefärbter Neurone. Die Grafik zeigt eine Gegenüberstellung repräsentativer Ausschnitte Golgi-gefärbter 100 µm dicker Sagittalschnitte nach 14 Tagen (**A**) in der Imprägnierungslösung (männliche, wildtypische, 33 Wochen alte Maus) bzw. 20 Tagen (**B**) in der Imprägnationslösung (weibliche heterozygote, 39 Wochen alten Maus). Die weitere Färbeprozedur, das Schneiden der Gehirnschnitte sowie die nachfolgende Bildaufnahme und Bearbeitung unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen (Kapitel 6.2.2). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Des Weiteren erfolgte eine Betrachtung des Einflusses der Einwirkzeit der Färbelösung auf die Dichte der gefärbten Neurone. Die aufgenommenen Bilder waren nach einer Einwirkdauer der Färbelösung innerhalb des getesteten Zeitraumes von 30 Sekunden bis zu 2 min optisch vergleichbar. Die Einwirkzeit der Färbelösung hatte dementsprechend keinen erkennbaren Einfluss auf die Dichte der gefärbten Neurone. Eine Einwirkzeit der Färbelösung von einer

Minute zeigte allerdings ein optimales Signal-Hintergrund-Verhältnis, sodass die Einwirkdauer auf diese Zeit festgesetzt wurde.

Die Markierungsdichte Golgi-gefärbter Neurone ergab eine deutliche Abhängigkeit von der Dicke der angefertigten Gehirnschnitte. Die Neuronendichte erschien mit zunehmender Schnittdicke größer (Abb. 14).

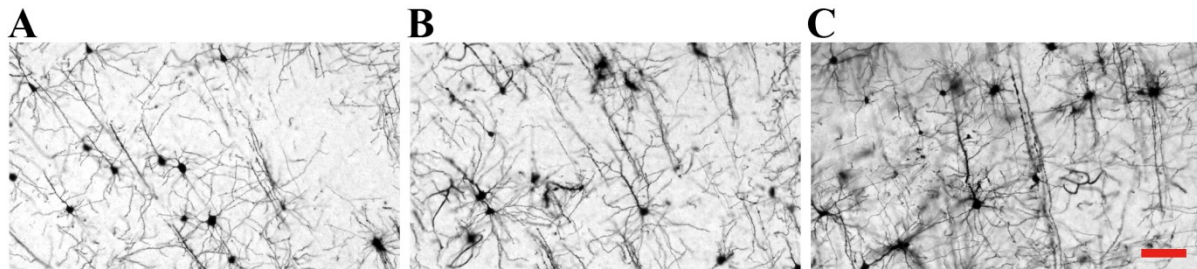


Abb. 14: Analyse des Einflusses der Schnittdicke auf die Dichte Golgi-gefärbter Neurone. Repräsentative Ausschnitte Golgi-gefärbter sagittaler Gehirnschnitte einer weiblichen, für Cobl heterozygoten, 39 Wochen alten Maus, mit Schnittdicken von 50 µm (A), 70 µm (B) und 100 µm (C). Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Prinzipiell zeigten dünnere Schnitte eine für die Auswertung günstigere Markierungsdichte. Gehirnschnitte mit Dicken unter 50 µm ließen sich jedoch am Kryostat, ohne dass es zu einer starken Beeinträchtigung der Kontinuität der Schnittländer kam, nicht schneiden. Unter Berücksichtigung der Praktikabilität und der Dichte gefärbter Neurone wurde eine Schnittdicke von 50 µm als optimal betrachtet.

7.3.1.2 Optimierung der Schneidequalität der Mausgehirne bei der Golgi-Färbung

Zur Überprüfung verschiedener Schneidevarianten wurden vier Testserien angefertigt und verglichen. Alle Serien beinhalteten weibliche, hinsichtlich des Cobl-Gens heterozygote Tiere.

Serie 1 bestand aus vier Tieren. Deren Gehirne wurden, wie in Rosario et al. (2012) beschrieben, direkt nach der Präparation der Gehirne mit einem Gewebehacker in 200 µm dicke sagittale und koronale Schnitte gehackt.

Die Dichte gefärbter Neurone war bei 200 µm allerdings zu hoch, um die Zellen mittels Imaris V7.6-Software morphologisch analysieren zu können, da die Neuronendichte mit steigender Schnittdicke anstieg. Weiterhin war die Schnittdicke sehr unregelmäßig und das Gewebe wurde mechanisch stark belastet, was bei der Auswertung der gefärbten Gehirnschnitte zu einer Verstärkung des Hintergrundes in den oberen neokortikalen Schichten führte.

Serie 2 bestand aus zwei Tieren. Deren Gehirne wurden zum Schneiden in Agarose eingebettet und am Kryostat geschnitten (vorbestehendes Protokoll). Die Einbettung in Agarose verschlechterte allerdings die Kontinuität der Schnittträger. Aus diesem Grund wurde auf eine Einbettung in Agarose verzichtet.

Serie 3 bestand aus einem Tier. Dessen Gehirn wurde nach Einwirkung der Imprägnierungslösung am Schlittenmikrotom geschnitten. Da das Schlittenmikrotom keine Vorrichtung zur kontinuierlichen Kühlung der Klinge besaß, war die Gewebestrukturerhaltung der resultierenden Schnitte sehr schlecht und das Schneiden am Schlittenmikrotom somit ungeeignet für Golgi-imprägnierte Gehirne.

Serie 4 bestand aus einem Tier. Dessen Gehirn wurde ohne jegliche Einbettung am Kryostat geschnitten.

Die Schnittqualität dieser Serie wurde hinsichtlich Praktikabilität, Qualität und resultierender Anzahl der durch die Imaris V7.6-Software auswertbaren Gehirnschnitte als optimale Schneidevariante bewertet. Aus diesem Grund wurde diese Variante zur Analyse der Morphologie Golgi-gefärbter Neurone angewendet.

Durch zusätzliche Verbesserungen des vorbestehenden Protokolls hinsichtlich der Haftung der Schnitte an den Objektträgern sowie der Einstellung der Kühltemperatur des Kryostats wurde die Färbetechnik nach Golgi optimiert. So konnte die benötigte Tierzahl für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und alle weiteren Experimente verringert und die resultierende Färbequalität deutlich verbessert werden.

7.3.2 Analyse der Morphologie des Dendritenbaumes von Schicht V-Pyramidenzellen

Schicht V-Pyramidenzellen haben einen großen und sehr komplexen Dendritenbaum, dessen Ausbildung während der Dendritogenese unter anderem durch dynamische Veränderungen des Aktinzytoskeletts gesteuert wird. Nachfolgend wurde daher untersucht, ob der zytoskelettale Aktin-Nukleationsfaktor Cobl Einfluss auf die Morphologie von Pyramidenzellen der Schicht V hatte. Zur globalen Analyse des Verzweigungsgrades von Schicht V-Pyramidenzellen wurde zunächst eine Scholl-Analyse durchgeführt (Abb. 15). Hierzu wurden 26 Schicht V-Pyramidenzellen von drei wildtypischen sowie 49 Schicht V-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen ausgewertet (jeweils 8 bis 19 Zellen pro Tier). Die Dendriten aller Zellen hatten im analysierten Bereich von 10 µm bis 95 µm vom Startpunkt (ca. 0 µm bis 85 µm von der Somaoberfläche, vgl. Abb. 12B) aus, mindestens einen Schnittpunkt mit jedem der Ringe in der Scholl-Analyse.

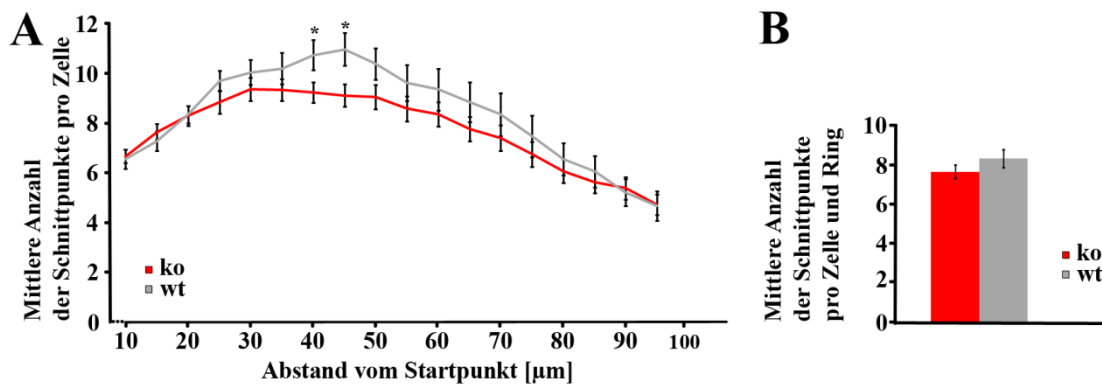


Abb. 15: Scholl-Analyse von Schicht V-Pyramidenzellen. Die Abbildung zeigt die Untersuchung des Dendritenbaumes von Schicht V-Pyramidenzellen (wt: 26, ko: 49) in Golgi-gefärbten Hirnschnitten von je drei männlichen Mäusen pro Genotyp. Die Tiere waren zwischen 17 und 19 Wochen alt. **(A)** zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse mittels Scholl-Analyse. Es konnte durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen mithilfe von IBM SPSS Statistics 22 keine Verschiedenheit der Kurvenverläufe zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Die mittlere Schnittpunktzahl jedes Ringes wurde zusätzlich zwischen wt und ko mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-Test* analysiert und in der Grafik abgebildet. Die Mittelwerte für jeden Ring \pm der zugehörigen SEMs sowie die Signifikanzniveaus sind dem Kapitel 11.3.1 zu entnehmen. **(B)** Es wurde ein Durchschnittswert für die Anzahl der Schnittpunkte pro Zelle, Ring und Genotyp gebildet und mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-Test* auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz hin überprüft. Statistische Signifikanz wird in der Abbildung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. In der Grafik wird der Mittelwert \pm des dazugehörigen SEMs dargestellt.

Statistisch signifikante Unterschiede in der Scholl-Analyse der Schicht V-Pyramidenzellen konnten mittels *Student's t-Test* nur in einem Abstand von 40 μm ($p = 0,04$) und 45 μm ($p = 0,02$) vom Startpunkt entfernt ermittelt werden (Abb. 15A). Die Varianzanalyse mit Messwiederholungen zum globalen Vergleich der Kurvenverläufe zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Der Vergleich der mittleren Schnittpunktzahl pro Schicht V-Pyramidenzelle und Ring zwischen wt und Cobl-ko zeigte ebenfalls keine signifikante Reduktion im ko (ko = $7,7 \pm 0,4$; wt = $8,3 \pm 0,5$; $p = 0,3$; Abb. 15B).

Aus der Scholl-Analyse war nicht ersichtlich, ob eine eventuell reduzierte Anzahl von Dendriten durch eine verstärkte Verzweigungsrate der Dendriten kompensiert wurde und so eine identische Zahl an Schnittpunkten in der Scholl-Analyse hervorrief. Um dies zu überprüfen, wurden im Anschluss an die globale Analyse des Dendritenbaumes nach Scholl detailliertere morphologische Parameter im Vergleich der Genotypen betrachtet.

Für die Detailanalysen zur Dendritenmorphologie wurden die in der Scholl-Analyse untersuchten Schicht V-Pyramidenzellen verwendet, einschließlich solcher Schicht V-Pyramidenzellen, deren Dendritenbaum nicht ausgedehnt genug war, um einen Schnittpunkt mit jedem der Ringe in der Scholl-Analyse bis zu einem Abstand von 95 μm

vom Startpunkt entfernt zu haben (wt = 28; ko = 50). Die Zellen wurden hinsichtlich der Dendriten erster Ordnung (repräsentierte die Anzahl der vom Soma abgehenden Dendriten; Abb. 16A) und der Anzahl der Verzweigungspunkte pro Zelle (repräsentierte die Verzweigungsstärke des gesamten Dendritenbaumes; Abb. 16B) ausgewertet. In die Analysen ging die maximale Ausdehnung jeder Zelle ein (sofern im Gewebeschnitt erhalten und durch die Analysesoftware detektierbar; Schwellenwerte sind im Kapitel 6.2.2.5 aufgeführt).

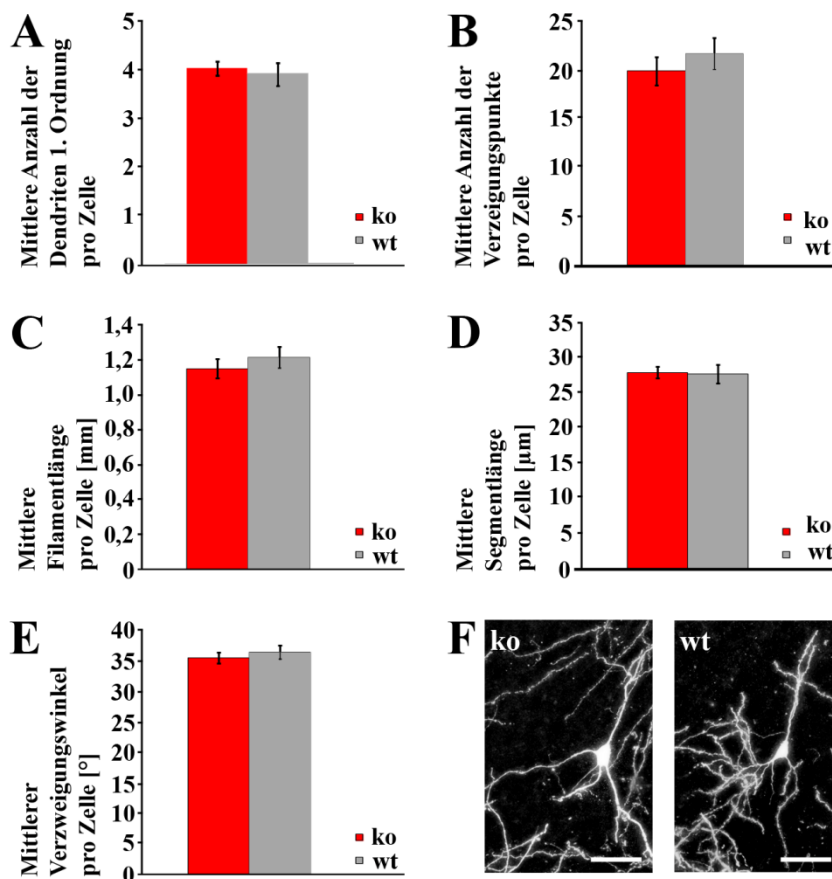


Abb. 16: Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen. Die Abbildung zeigt die Untersuchung des Dendritenbaumes von Schicht V-Pyramidenzellen bezüglich der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung (A), der Anzahl der Verzweigungspunkte (B), der Filamentlänge als Maß für die Gesamtlänge aller Dendriten (C), der Länge der einzelnen Segmente (D) sowie des Verzweigungswinkels (E) pro Zelle anhand der Mittelwerte von 28 Schicht V-Pyramidenzellen von drei wildtypischen sowie 50 Schicht V-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen. Die Mäuse waren männlich und zwischen 17 und 19 Wochen alt. Alle Parameter wurden mithilfe der Imaris V7.6-Software ausgewertet und durch einen zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz hin überprüft. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm der dazugehörigen SEMs dargestellt. Die Mittelwerte zu den entsprechenden Diagrammen einschließlich der zugehörigen Fehler sind im Anhang (Kapitel 11.3.1) aufgeführt. Zur Veranschaulichung ist eine Schicht V-Pyramidenzelle einer Cobl-ko-Maus (F links) einer Schicht V-Pyramidenzelle aus einer wildtypischen Maus (F rechts) gegenübergestellt. Die weißen Maßstabsbalken entsprechen 50 μ m.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung zwischen Schicht V-Pyramidenzellen von wildtypischen und Cobl-ko-Tieren

($4,0 \pm 0,1$ Dendriten erster Ordnung pro Schicht V-Pyramidenzellen des Cobl-ko und $3,9 \pm 0,2$ Dendriten erster Ordnung pro wildtypischer Schicht V-Pyramidenzelle; $p = 0,6$). In der Analyse der mittleren Anzahl der Verzweigungspunkte pro Zelle konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachgewiesen werden ($19,8 \pm 1,5$ Verzweigungspunkte pro Zelle für Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen und $21,6 \pm 1,6$ für wildtypische Schicht V-Pyramidenzellen; $p = 0,4$). Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Tieren besitzen demzufolge nicht signifikant weniger, kompensatorisch komplexer verzweigte Dendriten als im Wildtyp.

Weiterhin wurden die Schicht V-Pyramidenzellen bezüglich der Gesamtlänge ihres Dendritenbaumes (Filamentlänge; Abb. 16C) sowie hinsichtlich der mittleren Länge der einzelnen Segmente (Dendritenabschnitt zwischen zwei Verzweigungspunkten) verglichen. Daraus sollten weitere Erkenntnisse über Ausdehnung und Verzweigungsmuster der Zellen gewonnen werden. Hierzu wurde die Filamentlänge jeder Schicht V-Pyramidenzelle durch die Anzahl ihrer Segmente geteilt und so die mittlere Segmentlänge pro Zelle ermittelt. Anschließend wurden die Quotienten für jeden Genotyp gemittelt und miteinander verglichen (Abb. 16D). Dabei zeigte sich, dass sich die Länge der Filamente im Mittel nicht signifikant zwischen den Genotypen unterschied, genauso wie die mittlere Länge der einzelnen Segmente (Filamentlänge: $1,22 \pm 0,06$ mm für wildtypische und $1,16 \pm 0,06$ mm für Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen, $p = 0,5$; Segmentlänge: $27,5 \pm 1,3$ μ m für wildtypische und $27,8 \pm 0,8$ μ m für Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen, $p = 0,9$).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Dendritenbäume von Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen im Mittel keine geringere Ausdehnung oder Verzweigungsrate aufwiesen als in wildtypischen Tieren, wurde als ein weiterer Parameter zur Beschreibung des Verzweigungsphänotyps der Verzweigungswinkel betrachtet (Abb. 16E).

Zur Bestimmung des mittleren Verzweigungswinkels wurden zunächst alle Winkel einer Zelle, die von zwei Dendriten eingeschlossen wurden, gemittelt, um anschließend einen Durchschnittswert für jeden Genotyp zu berechnen. Dabei zeigten sich nur sehr geringe, nicht signifikante Abweichungen im mittleren Verzweigungswinkel zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen ($36,6^\circ \pm 1,1^\circ$ für wildtypische und $35,7^\circ \pm 0,9^\circ$ für Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen; $p = 0,5$).

Die Untersuchung der Dendritenbaummorphologie wurde durch die Analyse der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Dendritenordnungen vervollständigt (Abb. 17). Es wurde

neben dem bereits durchgeführten Vergleich der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung eine Übersicht über die absolute Häufigkeit aller vorhandenen Dendritenordnungen (erste bis 19. Ordnung) der Schicht V-Pyramidenzellen erstellt und zwischen den Genotypen verglichen. Auf diese Weise wurden die Zellen auf mögliche Häufigkeitsunterschiede einzelner Dendritenordnungen hin überprüft. Es wurden alle in den vorhergehenden Analysen zur Dendritenmorphologie betrachteten Schicht V-Pyramidenzellen analysiert und anschließend ein Durchschnittswert pro Zelle und Genotyp gebildet (ko: 50; wt: 28).

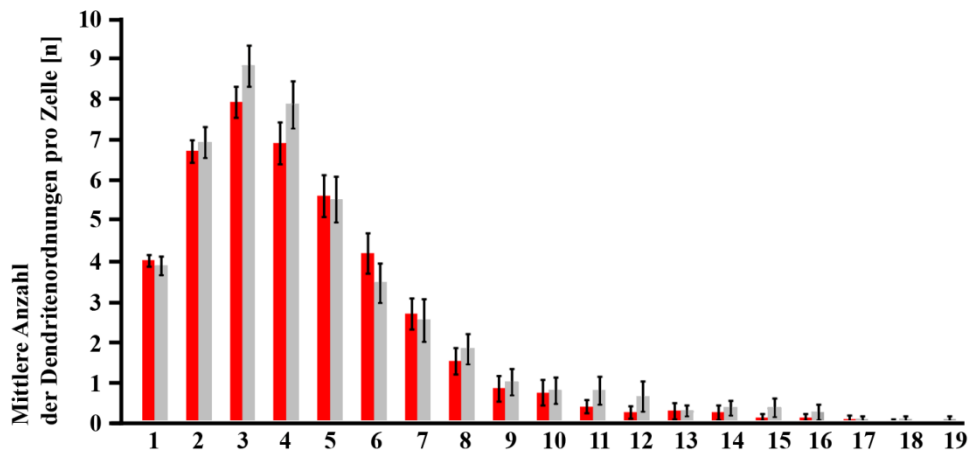


Abb. 17: Analyse der Dendritenordnungen von Schicht V-Pyramidenzellen. Die Abbildung basiert auf der Analyse Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen (ko: 50, wt: 28) aus männlichen 17 bis 19 Wochen alten Mäusen (ko: 3, wt: 3). Die Grafik zeigt den Vergleich von Cobl-ko-Mäusen mit wildtypischen Tieren hinsichtlich der absoluten Häufigkeit der einzelnen Dendritenordnungen pro Zelle im Vergleich der Genotypen. Die Mittelwerte sowie die SEMs der Mittelwerte können dem Kapitel 11.3.1 entnommen werden. Auf statistische Signifikanz hin wurde durch Vergleich der Mittelwerte von wt und Cobl-ko für jede Ordnung mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test getestet.

Es zeigten sich in der Analyse der absoluten Häufigkeit der ersten bis 19. Dendritenordnung bei keiner Ordnung signifikante Unterschiede zwischen Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen und wildtypischen Schicht V-Pyramidenzellen, wobei die 17., 18. und 19. Ordnung aufgrund der absolut zu geringen Anzahl an Dendriten nicht mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test verglichen werden konnten.

Nach Auswertung der Morphologie Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen konnte festgestellt werden, dass die Dendritenbäume von Schicht V-Pyramidenzellen in Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Zellen nicht weniger ausgedehnt oder weniger verzweigt waren (keine geringere Filamentlänge und keine geringere Anzahl von Verzweigungspunkten). Schicht V-Pyramidenzellen im Cobl-ko wiesen nicht signifikant weniger Dendriten erster Ordnung auf als wildtypische Schicht V-Pyramidenzellen. Hinsichtlich der mittleren Länge der einzelnen Segmente sowie des mittleren

Verzweigungswinkels war die sehr geringe Variabilität zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Pyramidenzellen auffällig. Auch hinsichtlich der absoluten Häufigkeit der einzelnen Dendritenordnungen konnten keine Unterschiede zwischen den Schicht V-Pyramidenzellen der beiden Genotypen festgestellt werden.

7.3.3 Analyse der Morphologie des Dendritenbaumes von Schicht III-Pyramidenzellen

Pyramidenzellen der Schicht III sind im sensorischen Kortex von großer Bedeutung, da an diesen Zellen die aufsteigenden sensorischen Bahnen des Thalamus enden (Squire et al. 2003). Nachdem eine signifikante Änderung der laminaren Organisation im sensorischen Neokortex von Cobl-ko-Mäusen aufgezeigt werden konnte, wurden nach der Analyse der Schicht V-Pyramidenzellen auch Pyramidenzellen der Schicht III im Detail untersucht. Zur globalen Untersuchung der Morphologie von Schicht III-Pyramidenzellen wurde ebenfalls eine Scholl-Analyse unter Verwendung der bereits für die Analyse der Schicht V-Pyramidenzellen verwendeten Golgi-gefärbten Hirnschnitte durchgeführt (Abb. 18). Hierzu wurden 32 Schicht III-Pyramidenzellen von drei wildtypischen und 45 Schicht III-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen ausgewertet (jeweils 7 bis 20 Zellen pro Tier). Alle in der Scholl-Analyse betrachteten Zellen hatten mindestens einen Schnittpunkt mit jedem der Ringe im Analysebereich von 10 μm bis 85 μm vom Startpunkt (0 μm bis 75 μm von der Somaoberfläche, vgl. Abb. 12B). Kürzere Schicht III-Pyramidenzellen wurden nicht mit einbezogen, um den Verlauf der Kurven in der Scholl-Analyse nicht durch eine Überrepräsentation bestimmter Dendritenabschnitte zu verfälschen.

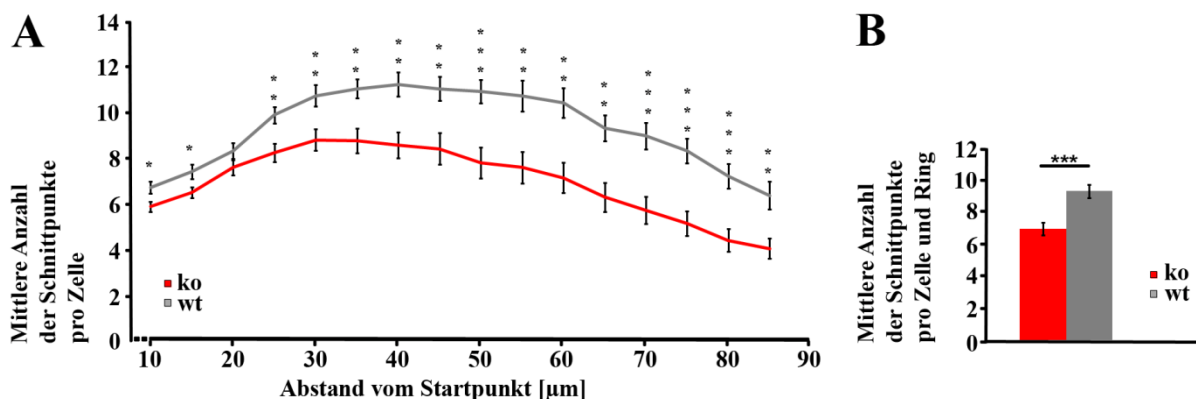


Abb. 18: Scholl-Analyse von Schicht III-Pyramidenzellen. Die Abbildung zeigt die Untersuchung des Dendritenbaumes von Schicht III-Pyramidenzellen (wt: 32, ko: 45) in Golgi-gefärbten Hirnschnitten von je drei männlichen Mäusen pro Genotyp. Die Tiere waren zwischen 17 und 19 Wochen alt. **(A)** zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse mittels Scholl-Analyse. Die mittlere Schnittpunktzahl jedes Ringes wurde zwischen den Genotypen mittels eines zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz hin überprüft und in der Grafik \pm der SEMs abgebildet. Die Mittelwerte \pm der SEMs für jeden Ring sowie die Signifikanzniveaus sind dem Kapitel

11.3.1 zu entnehmen. Die Verschiedenheit der Kurvenverläufe wurde zusätzlich durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen mithilfe von IBM SPSS Statistics 22 durch paarweisen Vergleich von wt und Cobl-ko nachgewiesen und konnte anschließend durch den Vergleich der Genotypen hinsichtlich der mittleren Anzahl der Schnittpunkte pro Zelle und Ring (als Mittelwert über den gesamten Kurvenverlauf) grafisch dargestellt werden (**B**). Hierfür wurde ein zweiseitiger, ungepaarter *Student's t*-Test verwendet. Statistische Signifikanz wird in der Abbildung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. In der Grafik wird der Mittelwert \pm des dazugehörigen SEMs dargestellt.

Die Scholl-Analyse der Schicht III-Pyramidenzellen ergab einen deutlich veränderten Kurvenverlauf bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen gegenüber dem wt, was durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen für den gesamten untersuchten Bereich nachgewiesen werden konnte. Der differenzierte Vergleich der Genotypen bezogen auf die mittlere Schnittpunktzahl der Dendriten einer Zelle mit den Ringen der Scholl-Analyse in distinkten Abständen erbrachte, außer in einer Distanz von 20 μm vom Startpunkt, eine signifikante Reduktion der Schnittpunktzahl im Cobl-ko (Abb. 18A). Der Vergleich der mittleren Schnittpunktzahl pro Zelle und Ring, als Mittelwert über den gesamten Kurvenverlauf, zeigte eine Verringerung von durchschnittlich $9,3 \pm 0,4$ Schnittpunkten pro Zelle und Ring bei wildtypischen Pyramidenzellen auf $7,0 \pm 0,4$ Schnittpunkten pro Zelle und Ring bei Cobl-ko-Pyramidenzellen (Abb. 18B; $p = 0,0003$).

Zu Beginn wurde überprüft, ob der signifikant unterschiedliche Verlauf der Kurven in der Scholl-Analyse auf einer reduzierten Anzahl von Dendriten erster Ordnung oder bzw. und einer verringerten Anzahl von Verzweigungen dieser Dendriten beruhte. Im Anschluss daran wurden als weitere morphologische Parameter die mittlere Filament- und Segmentlänge sowie der mittlere Verzweigungswinkel pro Zelle mithilfe der Imaris V7.6-Software analysiert. Auf diese Weise konnte der Effekt der Cobl-Defizienz auf die Morphologie von Schicht III-Pyramidenzellen im Detail charakterisiert werden. In die Analysen gingen die maximalen Ausdehnungen aller in der Scholl-Analyse ausgewerteten Schicht III-Pyramidenzellen ein, sofern sie im Gewebeschnitt erhalten geblieben waren und durch die Analysesoftware detektiert werden konnten (Schwellenwerte im Kapitel 6.2.2.5 aufgeführt). Ausgewertet wurden weiterhin Schicht III-Pyramidenzellen, deren Dendritenbaum nicht ausgedehnt genug war, um einen Schnittpunkt mit jedem Ring in der Scholl-Analyse bis zu einem Abstand von 85 μm vom Startpunkt aus zu haben. In den Analysen wurden somit die Mittelwerte von 32 Schicht III-Pyramidenzellen von drei wildtypischen sowie 47 Schicht III-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen gebildet und zwischen den Genotypen verglichen (jeweils 8 bis 21 Zellen pro Tier).

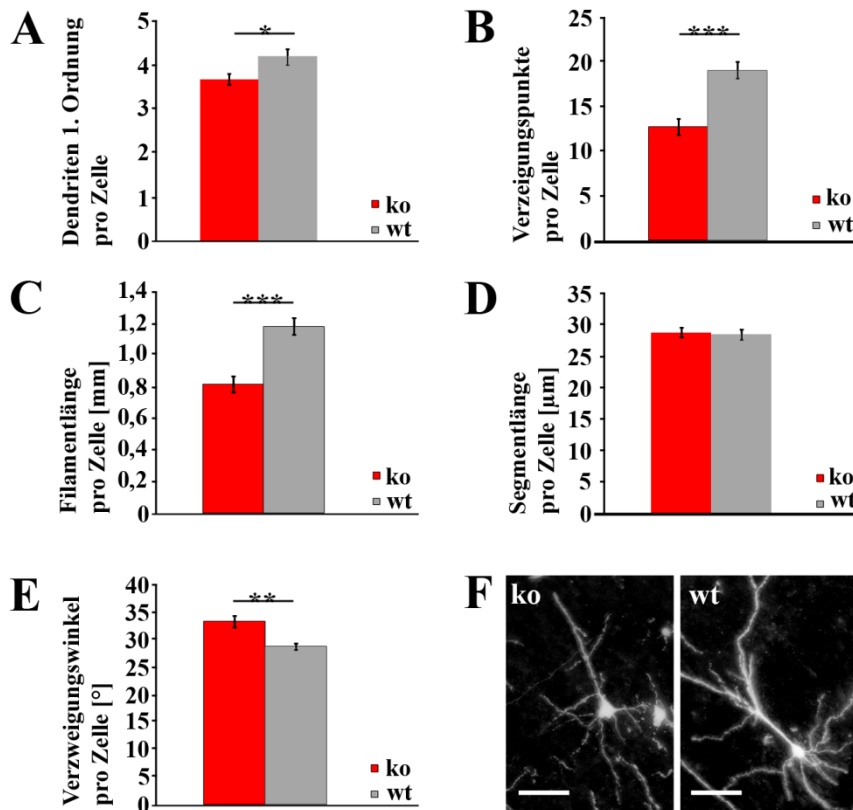


Abb. 19: Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen. Die Abbildung zeigt die Untersuchung des Dendritenbaumes von Schicht III-Pyramidenzellen bezüglich der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung (A), der Anzahl der Verzweigungspunkte (B), der mittleren Filamentlänge als Maß für die Gesamtlänge aller Dendriten (C), der Länge der einzelnen Segmente (D) sowie des mittleren Verzweigungswinkels (E) pro Zelle anhand der Mittelwerte von 32 Schicht III-Pyramidenzellen von drei wildtypischen sowie 47 Schicht III-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen. Die Mäuse waren männlich und zwischen 17 und 19 Wochen alt. Alle Parameter wurden mithilfe der Imaris V7.6-Software ausgewertet und durch einen zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test auf Signifikanz der Mittelwertdifferenz hin überprüft. Statistische Signifikanz wird in der Abbildung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. In den Grafiken werden die Mittelwerte \pm der dazugehörigen SEMs dargestellt. Die Mittelwerte, SEMs und Signifikanzniveaus der Diagramme sind im Anhang (Kapitel 11.3.1) aufgeführt. Zur Veranschaulichung ist eine Schicht III-Pyramidenzelle aus einer Cobl-ko-Maus (F links) einer Schicht III-Pyramidenzelle aus einer wildtypischen Maus (F rechts) gegenübergestellt. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung pro Schicht III-Pyramidenzelle (Abb. 19A; im Mittel $3,7 \pm 0,1$ Dendriten erster Ordnung pro Schicht III-Pyramidenzelle von Cobl-ko-Mäusen und $4,2 \pm 0,2$ Dendriten erster Ordnung pro wildtypischer Schicht III-Pyramidenzelle, $p = 0,02$). Weiterhin konnte für die mittlere Anzahl der Verzweigungspunkte pro Schicht III-Pyramidenzelle ein signifikanter Unterschied zwischen Schicht III-Pyramidenzellen von wildtypischen und Cobl-ko-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 19B; im Mittel $12,7 \pm 0,9$ Verzweigungspunkte pro Schicht III-Pyramidenzelle von Cobl-ko-Mäusen und $19,1 \pm 0,9$ Verzweigungspunkte pro Zelle für wildtypische Schicht III-Pyramidenzellen, $p = 1,2 \times 10^{-5}$). Die zwischen den

Genotypen differierenden Kurvenverläufe in der Scholl-Analyse von Schicht III-Pyramidenzellen (Abb. 18A) sind ursächlich somit sowohl auf eine verringerte Anzahl von Dendriten 1. Ordnung als auch auf eine reduzierte Verzweigungsrate der Dendriten der Schicht III-Pyramidenzellen im Cobl-ko zurückzuführen.

Zur Charakterisierung des Phänotyps wurden im Anschluss an diese Untersuchungen auch für die Pyramidenzellen der Schicht III die mittleren Filament- und Segmentlängen ermittelt und zwischen den Genotypen verglichen. Die mittlere Segmentlänge ergab sich dabei aus der Division der Filamentlänge jeder Zelle durch die Anzahl ihrer Segmente. Verglichen wurden die Mittelwerte aller Tiere eines Genotyps (Abb. 19C und 19D).

Diese Untersuchungen ergaben, dass die Filamentlänge im Gegensatz zur Länge der einzelnen Segmente in Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Tieren signifikant geringer war als in Schicht III-Pyramidenzellen aus wildtypischen Tieren (Filamentlänge: $0,82 \pm 0,05$ mm für Pyramidenzellen der Schicht III aus Cobl-ko-Mäusen und $1,19 \pm 0,05$ mm für wildtypische Schicht III-Pyramidenzellen, $p = 6,8 \times 10^{-6}$; Segmentlänge: $28,8 \pm 0,8$ μ m für Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen und $28,5 \pm 0,8$ μ m für wildtypische Pyramidenzellen in der Schicht III, $p = 0,8$).

Zudem wurde die Auswirkung der veränderten Morphologie des Dendritenbaumes auf den Verzweigungswinkel der Dendriten untersucht. Hierzu wurde analog zu den Untersuchungen der Schicht V-Pyramidenzellen verfahren. Durch diese Analysen konnte eine signifikante Vergrößerung des dendritischen Verzweigungswinkels in Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen gegenüber Schicht III-Pyramidenzellen aus wildtypischen Mäusen gezeigt werden (Abb. 19E; $33,3^\circ \pm 1,0^\circ$ für Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen und $28,7^\circ \pm 0,6^\circ$ für wildtypische Schicht III-Pyramidenzellen, $p = 0,0011$).

Um eine umfassende Analyse der dendritischen Struktur von Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen durchzuführen, wurde neben dem bereits durchgeführten Vergleich der mittleren Anzahl der Dendriten erster Ordnung eine Häufigkeitsverteilung aller vorhandenen Dendritenordnungen erstellt. Dafür wurde ein Durchschnittswert für die absolute Anzahl der Dendriten der ersten bis zehnten Ordnung pro Schicht III-Pyramidenzelle gebildet und zwischen den Genotypen verglichen (Abb. 20). Durch diese Untersuchungen konnte eine mögliche Anhäufung einzelner Dendritenordnungen erfasst werden.

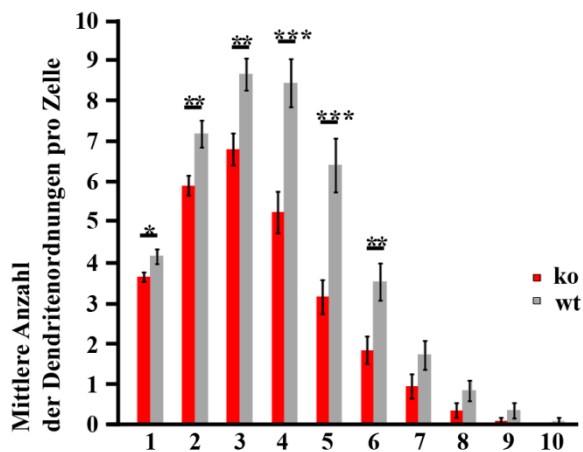


Abb. 20: Analyse der Dendritenordnungen von Schicht III-Pyramidenzellen. Die Abbildung basiert auf der Analyse Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen (ko: 47, wt: 32) aus männlichen 17 bis 19 Wochen alten Mäusen (ko: 3, wt: 3). Die Grafik zeigt einen Vergleich von Cobl-ko-Mäusen mit wildtypischen Tieren, bezogen auf die absolute Häufigkeit der ersten bis zehnten Dendritenordnung je Schicht III-Pyramidenzelle. Die Mittelwerte sowie die SEMs und die entsprechenden Signifikanzniveaus können dem Kapitel 11.3.1 entnommen werden. Statistische Signifikanz wurde durch den Vergleich der Mittelwerte von wt und Cobl-ko für jede Ordnung mittels *Student's t-Test* nachgewiesen und grafisch dargestellt. Statistische Signifikanz wird in der Abbildung durch * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ gekennzeichnet. In der Grafik wird der Mittelwert \pm des dazugehörigen SEMs dargestellt.

Die Untersuchung ergab eine, über die Verringerung der absoluten Anzahl an Dendriten erster Ordnung hinausgehende, reduzierte Anzahl an Dendriten der zweiten bis sechsten Ordnungen bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen gegenüber wildtypischen Schicht III-Pyramidenzellen (zweite Ordnung: ko = 5,9; wt = 7,2; $p = 0,002$; dritte Ordnung: ko = 6,8; wt = 8,7; $p = 0,002$; vierte Ordnung: ko = 5,3; wt = 8,5; $p = 0,00013$; fünfte Ordnung: ko = 3,2; wt = 6,4; $p = 5 \times 10^{-5}$; sechste Ordnung: ko = 1,9; wt = 3,6; $p = 0,004$). Die absoluten Anzahlen der Dendriten der siebenten bis zehnten Ordnungen waren ebenfalls im wt größer als im Cobl-ko, die insgesamt geringe Zahl der Dendriten dieser Ordnungen verhinderten wahrscheinlich das Erreichen einer statistischen Signifikanz (Signifikanzniveaus im Kapitel 11.3.1). Dendriten der 10. Ordnung waren sogar nur in wildtypischen Schicht III-Pyramidenzellen vorhanden. Die Häufigkeitsunterschiede im Vergleich der Schicht III-Pyramidenzellen beider Genotypen waren hinsichtlich der Dendritenordnungen vier bis sechs deutlich stärker ausgeprägt als im Vergleich der ersten drei Dendritenordnungen (erste Ordnung: 11,9 %; zweite Ordnung: 18,1 %; dritte Ordnung: 21,8 %; vierte Ordnung: 37,6 %; fünfte Ordnung: 50,0 %; sechste Ordnung: 47,2 % prozentuale Reduktion im Cobl-ko gegenüber dem Wildtyp), so dass auf eine besonders stark ausgeprägte Reduktion der Dendriten höherer Ordnungen geschlossen werden kann.

Nach Abschluss der Analysen zur Morphologie Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass der Dendritenbaum von Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Zellen eine geringere Filamentlänge sowie eine verringerte Anzahl von Verzweigungspunkten aufwies. Die mittlere Anzahl der Dendriten erster Ordnung war bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen ebenfalls geringer als bei Schicht III-Pyramidenzellen aus wildtypischen Tieren. Die Länge der einzelnen Segmente unterschied sich allerdings nicht signifikant zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen. Der mittlere Verzweigungswinkel war bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen größer als bei wildtypischen Pyramidenzellen der Schicht III. In der Analyse der Häufigkeitsverteilung der Dendritenordnungen fanden sich absolut weniger Dendriten in den ersten sechs Ordnungen im Cobl-ko. Die Reduktion der absoluten Dendritenzahl der Schicht III-Pyramidenzellen im Cobl-ko gegenüber dem wt war bei höheren Ordnungen stärker ausgeprägt als bei niedrigeren Dendritenordnungen.

8 Diskussion

8.1 Der Aktinnukleator Cobl als ein Regulator der neuronalen Schichtenarchitektur

8.1.1 Defekte in Zytoskelett-assoziierten Proteinen verursachen strukturelle Organisationsstörungen im Neokortex

Auf der korrekten laminaren Organisation des Neokortex in radiären Schichten basieren sowohl die funktionelle Arealisierung des Neokortex als auch die Informationsverarbeitung innerhalb und zwischen den einzelnen Arealen. Störungen der neuronalen Migration während der Embryonalentwicklung können postnatal zu anormalen Schichtenstrukturen des Kortex führen, die mit schweren klinischen Folgen assoziiert sind (Bozzi et al. 2012). Bereits der Defekt eines Zytoskelettbestandteiles kann in einer Änderung der laminaren Schichtung resultieren und sich so klinisch manifestieren. Mutationen in Genen für Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie Doublecortin (DCX) und Lissencephaly-1 (LIS1) resultierten in einer gestörten Migration kortikaler Neurone zu ihrer physiologischen Lokalisation während der Neurogenese (Ross und Walsh 2001, Bielas und Gleeson 2004). Kumar et al. (2010) untersuchten Patienten mit Lissenzephalie und cerebellärer Hypoplasie und fanden eine Korrelation zu einer *missense*-Mutation im für die Tubulinuntereinheit TUBA1A kodierenden Gen. Neben den Mikrotubuli sind gerade die Aktinfilamente entscheidend für die Ausbildung neuronaler Zellmorphologien während der Embryonalentwicklung. In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang von Defekten in Genen, die für Aktinzytoskelett-assoziierte Proteine kodieren, mit einer veränderten kortikalen Schichtenorganisation gezeigt werden. Mutationen im Gen des F-Aktin bindenden zytoplasmatischen Phosphoproteins Filamin A konnten mit der Ausbildung distinkter Subgruppen der periventrikulären Heterotopie (v.a. die X-chromosomale periventrikuläre noduläre Heterotopie) beim Menschen in Zusammenhang gebracht werden (Robertson 2004, Parrini et al. 2006, Guerrini und Parrini 2010). Cappello et al. (2012) beschrieben die dramatischen Veränderungen im Neokortex von RhoA-ko-Mäusen. Die GTPase RhoA ist ein zentrales, das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett regulierendes Protein, dessen Defizienz zu Störungen der Neokortexschichtung führte. In dieser Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem zur Gruppe der *Double cortex*-Formationen gehörendem Krankheitsbild der Subkortikalen Bandheterotopie sowie der durch Migrationsstörungen hervorgerufenen *Cobblestone*-Kortexformation mit der genetischen Deletion von RhoA in der Maus bewiesen

werden. Durch *in utero*-Elektroporationsexperimente wurde allerdings gezeigt, dass die Migration der Neurone selbst nicht beeinträchtigt war. RhoA-defiziente Neurone migrierten sogar schneller und führten zu ektopen Ansammlungen von Nervenzellen unterhalb der *Pia mater* (Cobblestone-Kortex). Die Defekte in der radialen Migration der kortikalen Neurone in den RhoA-ko-Mäusen beruhten auf einer Störung der Aktin- und Mikrotubulipolymerisation in den als Leitstrukturen der neuronalen Migration dienenden Radialgliazellen (Cappello et al. 2012).

Wesentliche Bestandteile des dynamischen Zytoskeletts sind Aktinnukleatoren, welche die Neubildung von Aktinfilamenten initiieren. Der bekannteste und am besten charakterisierte Nukleationsfaktor von Aktinfilamenten ist der Arp2/3-Komplex (Pollard und Beltzner 2002, Pollard 2007). Er besteht aus sieben Untereinheiten, von denen zwei eine Homologie zu Aktin aufweisen (Arp2 und 3) und daher zusammen mit einem Aktin-Monomer einen Nukleationskeim ausbilden können (Millard et al. 2004). Ein postnataler, konditionaler ko des Arp3-Proteins, einer Komponente des Arp2/3-Komplexes, in hippocampalen Neuronen resultierte in einer progressiven Reduktion der *Spine*-Dichte in hippocampalen Pyramidenzellen *in vivo*. Eine Analyse des Neokortex erfolgte allerdings nicht (Kim et al. 2013). Der Arp2/3-Komplex ist in isolierter Form weitgehend inaktiv und benötigt daher zusätzliche Faktoren zur Aktivierung. Dies wird durch Proteine der WASP-Familie bewerkstelligt (Takenawa und Suetsugu 2007, Chen et al. 2010). Die Konsequenzen der Defizienz eines den Aktinnukleationskomplex Arp2/3 aktivierenden Proteins aus dieser Familie konnten durch Snapper et al. (2001) am Beispiel von N-WASP gezeigt werden. Unter N-WASP-Defizienz starben homozygote Mäuse bereits vor dem zwölften Embryonaltag und wiesen dabei Dilatationen des Herzens sowie Defekte in der Morphologie des Neuralrohrs auf. WAVE1 (WASP-family verprolin-homologous protein 1) gehört ebenfalls zur Familie der WASP-Proteine. Einen Einfluss des vorrangig neuronal exprimierten WAVE1 auf die Entwicklung des Zentralnervensystems konnte von Dahl et al. (2003) *in vivo* gezeigt werden. WAVE1-ko-Mäuse starben bereits wenige Tage nach der Geburt mit einer mittleren Lebenserwartung von nur 23,6 Tagen. Postnatal bestanden verschiedene Malformationen des Zentralnervensystems, weitere offenkundige Histopathologien innerer Organe allerdings nicht. Die Gehirne homozygoter WAVE1-ko-Mäuse insgesamt (gemessen am 18. postnatalen Tag) sowie verschiedene subkortikale Strukturen wie das Striatum, das laterale Septum und der Balken (gemessen am 20. postnatalen Tag) waren im Durchschnitt kleiner als im wt. Die Seitenventrikel waren erweitert. Im Kontrast zu diesen Veränderungen des Zentralnervensystems stand eine zwischen wt und WAVE1-ko unveränderte Morphologie der

einzelnen kortikalen Projektionsneurone in der Zellkultur und *in vivo*. Der Neokortex war am 20. postnatalen Tag in seiner Dicke insgesamt zwar reduziert, die kortikalen Schichten schienen allerdings alle angelegt zu sein (Dahl et al. 2003). Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Defekt eines Aktinnukleators und einer Störung der kortikalen Schichtenorganisation konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

8.1.2 Cobl verursacht strukturelle Organisationsstörungen im Neokortex

Im Gegensatz zu den für diese Aktinnukleatoren bzw. nukleationsfördernden Faktoren beschriebenen *loss-of-function* Phänotypen im Gehirn existieren für den neuartigen Aktinnukleator Cobl (Ahuja et al. 2007), der vorrangig neuronal und bereits während der Embryonalentwicklung im Gehirn exprimiert wird (Gasca et al. 1995, Carroll et al. 2003, Ahuja et al. 2007), bisher keine *in vivo*-Daten zum Einfluss von Cobl auf die Morphologie kortikaler Neurone. Über homologe Rekombination (Cre/loxP-System) in der Arbeitsgruppe generierte Cobl-ko-Mäuse (unpublizierte Daten N. Haag) konnten somit erstmals im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich kortikaler Entwicklungsdefekte untersucht werden. Im adulten Gehirn ist Cobl stark im Neokortex exprimiert. Anders als die für Arp2/3-Komponenten (Yae et al. 2006), N-WASP (Snapper et al. 2001) oder WAVE1 (Dahl et al. 2003) beschriebene frühe Letalität erreichten homozygote Cobl-ko-Mäuse das Erwachsenenalter (unpublizierte Daten, N. Haag), so dass die Untersuchung des adulten murinen Neokortex möglich war.

In Analogie zu Rosario et al. (2012), die drastische Auswirkungen des Verlustes des Zytoskelett-regulierenden Proteins NIMA-GAP auf die Dicke des gesamten Neokortex adulter Mäuse zeigen konnten, wurden die Analysen des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen mit einer Untersuchung der Gesamt-Neokortexdicke begonnen. Im Gegensatz zu einer durch ko von Aktinzytoskelett-assoziierten Proteinen, wie NIMA-GAP (Rosario et al. 2012) oder WAVE1 (Dahl et al. 2003) bedingten Verringerung der Neokortexdicke konnte für den Cobl-ko keine Reduktion der gesamten Neokortexdicke statistisch signifikant nachgewiesen werden. Die auf anti-Cux1-Immunfluoreszenzfärbungen basierende Analyse der einzelnen kortikalen Schichten in Cobl-ko-Tieren erlaubte darüber hinaus eine differenzielle Betrachtung der Dicken der kortikalen Schichten I, II-IV und V-VI (Abb. 7). Durch diese Untersuchungen konnte eine deutliche kortikale Strukturänderung gezeigt werden (Abb. 9 und 21A). Cobl-ko-Mäuse zeichneten sich durch signifikante Unterschiede in der relativen Ausdehnung ihrer kortikalen Schichten gegenüber dem wt aus, wobei sich der Phänotyp über alle untersuchten Kortexregionen (frontal, medial, okzipital) hinweg in einer Ausdehnung des relativen Anteils der Schichten II-IV und einer Verringerung des Anteils der

Schichten V-VI an der gesamten Neokortexdicke manifestierte. Aufgrund größerer intra- und interindividueller Schwankungen der Kortexdicke ergaben sich keine statistischen Signifikanzen beim Vergleich der absoluten Schichtdicken im medialen und okzipitalen Bereich (Abb. I). Im frontalen Abschnitt zeigte die Analyse der absoluten Schichtdicken analog zu der Untersuchung der relativen Schichtdicken eine signifikante Ausdehnung der kortikalen Schichten II-IV und eine Verschmälerung der Schichten V-VI. Die Ausdehnung der Schicht I im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen unterschied sich weder absolut noch relativ signifikant vom wt. Die Analysen zur laminaren Organisation des Neokortex ergaben besonders in den Bereichen Unterschiede auf hohem Signifikanzniveau, in denen ausschließlich der somatosensorische Kortex untersucht wurde (frontal, medial). Die Analyse dieser funktional und damit wahrscheinlich auch morphologisch einheitlicheren Kortexregion verringerte wahrscheinlich die intra- und interindividuelle Schwankungsbreite der gemessenen Schichtenausdehnungen und führte so zu einem höheren Signifikanzniveau.

Den Veränderungen in der laminaren Organisation des Cobl-ko-Kortex können Veränderungen der Neuronendichte ursächlich zugrunde liegen. So kann eine Ausdehnung bzw. Verschmälerung einer kortikalen Schicht auf einer erhöhten bzw. reduzierten Dichte von Nervenzellen in dieser Schicht beruhen. Überlappungseffekte der Zellkerne besonders in der zellreichen Schicht IV verhinderten eine direkte Analyse der Zelldichte (Abb. II). Aus diesem Grund wurde eine Analyse der Kernfläche als Maß für die Zelldichte durchgeführt. Hierbei wurde der Anteil der von Zellkernen bedeckten Fläche an der gesamten untersuchten Fläche in den pyramidenzellreichen Schichten III und V sowie in der im somatosensorischen Kortex besonders zellreichen Schicht IV zwischen den Genotypen verglichen (Abb. 10 und 21B). Zwischen einer Erhöhung der Kernfläche aufgrund einer erhöhten Dichte von Zellen und bzw. oder einer Vergrößerung der Zellkerne konnte nicht differenziert werden. Eine die Kerngröße beeinflussende Cobl-Funktion im Zellkern ist aufgrund einer putativen Kernlokalisationssequenz im Cobl-Protein (Ahuja et al. 2007) alternativ denkbar. Lane et al. (1969) vermuteten erstmals eine nukleäre Lokalisation von Aktin. Nukleäres Aktin ist dabei in unterschiedliche Prozesse bei der Genexpression involviert (Vartiainen 2008, Zheng et al. 2009). Über eine mögliche Bedeutung der Cobl-Expression im Nukleus existieren allerdings noch keine publizierten Daten. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Kernfläche als Maß für die Zelldichte verwendet.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Zelldichte in den Schichten III und IV im medialen Kortex-Bereich von Cobl-ko-Mäusen gegenüber dem wildtypischen Neokortex. Die

Zelldichte in der Schicht V war im Vergleich der Genotypen weder frontal, noch medial oder okzipital signifikant verändert. Die größere Ausdehnung der Schichten II-IV geht daher im medialen Bereich mit einer erhöhten Zelldichte einher. Die größere Ausdehnung der Schichten II-IV im frontalen, medialen und okzipitalen Bereich lässt bei unveränderter (frontal, okzipital) bzw. erhöhter (medial) Zelldichte eine insgesamt erhöhte Neuronenzahl vermuten. Die Ausdehnung der Schichten V-VI war im ko kleiner. Da so eventuell weniger Platz für die Neurone der kortikalen Schichten V-VI zur Verfügung steht, kann bei nicht signifikant erhöhter Zelldichte in der Schicht V eine reduzierte Zellzahl in den unteren kortikalen Schichten vermutet werden.

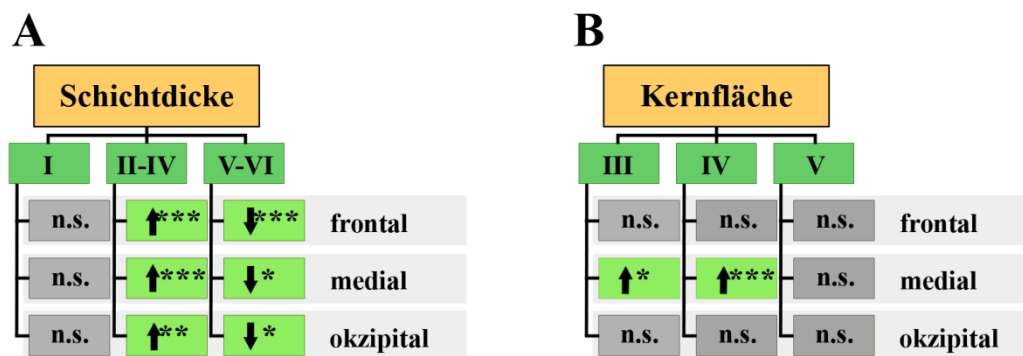


Abb. 21: Zusammenfassung der Analysen zur laminaren Organisation des murinen Neokortex. Übersicht über alle ausgewerteten Parameter zur Analyse der relativen Ausdehnung der sechs kortikalen Schichten und der Untersuchungen zur Kernfläche (als Maß für die Zelldichte) in ausgewählten Schichten. Nach unten zeigende Pfeile symbolisieren eine signifikante Verringerung, nach oben zeigende Pfeile eine signifikante Vergrößerung des relativen Anteils der entsprechenden Kortexschicht (A) bzw. der Kernfläche (B) in Cobl-ko-Mäusen gegenüber wildtypischen Mäusen. Angaben zu den Methoden der Analysen können den Legenden der Abbildungen 9 und 10 entnommen werden. Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test überprüft. Statistische Signifikanz wird in der Grafik wie folgt dargestellt: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ (n.s. = nicht signifikant).

8.1.3 Mögliche Ursachen neokortikaler Architekturstörungen unter Cobl-Defizienz

Aus den Ergebnissen der Analysen zur laminaren Organisation des murinen Neokortex wurde auf eine phänotypisch bedeutsame Rolle des Aktinnukleators Cobl bei der Ausbildung der korrekten kortikalen Architektur im adulten Organismus geschlussfolgert. Cobl-Defizienz verursachte eine signifikante Verschiebung des relativen Anteils der kortikalen Schichten, nicht jedoch der gesamten Neokortexdicke. Cobl-vermittelte Aktinnukleation hatte somit eine fundamentale Bedeutung entweder bei der Ausbildung neokortikaler Schichtenstrukturen während der Entwicklung der Tiere oder bei ihrer Aufrechterhaltung in adulten Mäusen. Eine Untersuchung des juvenilen Mausgehirns könnte wichtige Erkenntnisse hinsichtlich dieser Frage erbringen, da ein entwicklungsbedingter Phänotyp im Gegensatz zu einer neurodegenerativen Störung bereits im juvenilen Kortex auftreten würde. Da derartige

Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, kann über die Genese des Phänotyps zurzeit nur spekuliert werden. Die in verschiedenen Studien beschriebene Bedeutung von Cobl während der Neurogenese (Gasca et al. 1995, Carroll et al. 2003, Ahuja et al. 2007) lässt einen entwicklungsabhängigen Effekt von Cobl als wahrscheinlichste Ursache des Phänotyps erscheinen. Cobl-Defizienz führte in primären hippocampalen Neuronen sowohl zu einer verringerten Anzahl von Verzweigungspunkten als auch zu einer Reduktion primärer Dendriten (Ahuja et al. 2007, Schwintzer et al. 2011) und in Purkinjezellen des Kleinhirns zu einer Verringerung der Anzahl der Verzweigungspunkte sowie der Dendriten höherer Ordnung (Haag et al. 2012). Diese neuroentwicklungsbiologischen Konsequenzen einer Cobl-Defizienz unterstützen die These eines entwicklungsabhängigen Phänotyps.

Dynamische Aktinfilamente bilden die zytoskelettale Grundlage neuronaler Migration während der Embryonalentwicklung. Cobl liegt auf zellulärer Ebene angereichert in neuronalen Zellfortsätzen wie den axonalen Wachstumskegeln (Ahuja et al. 2007) vor. Aufgrund der funktionellen Bedeutung des Aktinnukleators Cobl für das neuronale Aktinzytoskelett erscheint eine mögliche migrationsfördernde Wirkung der Cobl-Expression auf kortikale Neurone und dementsprechend eine Migrationshemmung durch Cobl-Defizienz naheliegend. Die Expansion der oberen und Verschmälerung der unteren kortikalen Schichten widerspricht offensichtlich dieser Vermutung, da scheinbar vermehrt Zellen in, von den Wachstumszonen weiter entfernte, obere kortikale Schichten migrieren. Dieser Widerspruch könnte durch eine ausschließliche Hemmung der neuronalen Migration unter Cobl-Defizienz in Schicht V und VI-Neuronen verbunden mit einer sekundären Kompensation der Migrationshemmung durch eine verstärkte Wanderung der Schicht II-, III- und IV-Neurone in die oberen kortikalen Schichten erklärt werden. Der differierende embryonale Ursprungsort und die zeitlich gestaffelte Migration der Neurone distinkter Schichten aus den Wachstumszonen zu ihrer physiologischen Lokalisation könnten dabei von Bedeutung sein. Schicht V/VI-Neurone entstehen vorrangig direkt aus Vorläuferzellen der Ventrikularzone, während die Vorläuferzellen der Schicht II-IV-Neurone zunächst in die sekundäre Wachstumszone, die Subventrikularzone migrieren. Untere kortikale Schichten werden dabei zeitlich vor den oberen kortikalen Schichten gebildet (Kandel et al. 1996, Dehay und Kennedy 2007, Kwan et al. 2012). Durch Zellmarkierungsexperimente zu verschiedenen Zeiten der Embryonalentwicklung könnten kortikale Neurone verschiedener Wachstumszonen markiert werden. Zur Markierung könnte z. B. Bromdesoxy-Uridin (BrdU) verwendet werden, welches in die DNA von Zellen während ihrer letzten Teilung eingebaut wird und auf diese Weise zu

unterschiedlichen Zeiten der Embryonalentwicklung geborene Neuronenpopulationen markiert. Anschließend könnte eine differentielle Betrachtung der Migrationsraten dieser Neurone erfolgen. Diese Experimente würden wichtige neue Erkenntnisse über eine eventuell zwischen den Neuronenpopulationen distinkter Schichten differierende Bedeutung der Cobl-Expression auf die Migrationsrate erbringen.

Neuere Analysen zur Rolle des aktinnukleierenden Formins mDia für die Migration kortikaler Neurone zeigen ein alternatives Modell der Genese einer veränderten laminaren Kortexorganisation auf. Shinohara et al. (2012) konnten in Zellmarkierungsexperimenten an Gehirnschnitten embryonaler Mäuse die migrationsfördernde Wirkung eines Doppel-ko der kortikal exprimierten Isoformen mDia1 und mDia3 auf die radiale Migration von Nervenzellen aus der Ventrikularzone während der Embryonalentwicklung zeigen. Eine höhere Anzahl der an Embryonaltag 15,5 markierten Zellen der Ventrikularzone erreichten am Embryonaltag 18,5 die oberen kortikalen Schichten. Die tangentielle Migration der Interneurone war allerdings signifikant vermindert, so dass sich im adulten sensorischen Neokortex signifikant weniger GABAerge Interneurone fanden. mDia1/3-Defizienz hatte allerdings keine signifikante Auswirkung auf die durch anti-Cux1-Immunfärbungen definierte Ausdehnung der Schichten II-IV sowie auf die an Nissl-gefärbten Schnitten gemessene Dicke des gesamten sensorischen Neokortex zum Zeitpunkt der Geburt der Mäuse. Eine mögliche migrationsfördernde Wirkung der Cobl-Defizienz könnte analog zu einem mDia1/3-Doppel-ko eine Induktion der radialen Migration von Pyramidenzellen aus der Ventrikularzone in höhere kortikale Schichten bewirken und so zu der beobachteten Expansion der Schichten II-IV im Cobl-ko führen.

Die nicht signifikant veränderte Ausdehnung der Schicht I im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen war mit der, im Gegensatz zu den anderen kortikalen Schichten, fehlenden Cobl-Expression vereinbar (Abb. 11D). Die fehlende Cobl-Expression in der Schicht I sollte vor dem Hintergrund einer sehr geringen absoluten Zellzahl und eines von den Schichten II-VI differierenden embryonalen Ursprungs betrachtet werden (Molyneaux et al. 2007, Kwan et al. 2012). Die Schicht I geht aus der Marginalzone hervor, während die kortikale Platte die Schichten II-VI bildet.

Die Untersuchungen zur laminaren Organisation des Neokortex RhoA-defizienter Mäuse durch Cappello et al. (2012) werfen zusätzlich die Frage nach der Bedeutung der Radialgliazellen in der Genese des Schichtenphänotyps im Neokortex Cobl-defizienter Mäuse auf. Genetischer ko des Zytoskelett-assoziierten Proteins RhoA führte zur Ausbildung einer

subkortikalen Bandheterotopie und einer *Cobblestone*-Lissenzephalie durch Störungen der neuronalen Migration. Die Migration RhoA-defizienter Neurone war nach Transplantation in wildtypische murine Gehirne allerdings unbeeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde eine Beeinträchtigung der neuronalen Umgebung als Ursache des Phänotyps vermutet und durch weitergehende Untersuchungen bestätigt. Radialgliazellen entsprechen im gesunden Kortex Leitstrukturen, an denen sich migrierende Neurone orientieren. Es zeigten sich im RhoA-ko Defizite in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellfortsätze der Radialgliazellen, welche als Ursache der neuronalen Migrationsstörungen betrachtet wurden (Cappello et al. 2012). Untersuchungen zur Beantwortung der Frage nach der Bedeutung einer Cobl-Defizienz für die Morphologie und Funktion der Radialgliazellen konnten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden.

Das Aktinzytoskelett ist neben der Dendritogenese auch für die Ausbildung motiler Zilien von Bedeutung (Molla-Herman et al. 2010). Der Aktinnukleator Cobl wurde von verschiedenen Autoren als ein Regulator der Aktindynamik während der Ziliogenese beschrieben (Ravanelli und Klingensmith 2011, Schüler et al. 2013). Durch *knockdown* mithilfe der Morpholino-Technik konnte die fundamentale Bedeutung von Cobl für die Entwicklung von Organen mit motilen Zilien (Pronephros und Kupfersche Vesikel) im Zebrafisch gezeigt werden (Ravanelli und Klingensmith 2011). Ein *knockdown* von Cobl oder seinem Interaktionspartner Syndapin I führte im Zebrafisch zu einem analogen Phänotyp, welcher durch Verkürzung der Kinozilien und Stereozilien der Haarzellen des Seitenlinienorgans und damit einhergehenden Funktionsdefekten der sensorischen Haarzellen gekennzeichnet war (Schüler et al. 2013).

Die Entwicklung motiler Zilien ist wichtig für die Ausbildung der Zellpolarität neuronaler Stammzellen und somit von grundlegender Bedeutung während der Neurogenese (Das und Storey 2014). Eine Vielzahl von Erkrankungen aus der Familie der Ziliopathien wie das Joubert-Syndrom und das Bardet-Biedl-Syndrom gehen mit neuronalen Strukturstörungen einher (Rooryck et al. 2007, Giordano et al. 2009, Lee und Gleeson 2011). Dem Bardet-Biedl-Syndrom liegt eine Funktionsstörung der Bardet-Biedl-Syndrom-Proteine zugrunde. In neueren Studien konnte festgestellt werden, dass diese Proteine die Zilienlänge durch eine Regulation der Aktinpolymerisation über eine Modulation des RhoA-Levels kontrollieren (Hernandez-Hernandez et al. 2013). Defekte in Zilienaufbau und -funktion durch Cobl-Defizienz könnten die neuronale Entwicklung beeinträchtigen und die Ausbildung eines kortikalen Phänotyps in Cobl-defizienten Organismen somit ebenfalls bedingen. Es

sollten weitere Studien folgen, die die Auswirkungen einer Cobl-Defizienz auf die Morphologie muriner kortikaler Zilien adressieren.

8.2 Cobl als ein Regulator der Neuromorphogenese

Die Funktionen des Neokortex beruhen auf einem hochkomplexen Zusammenspiel physiologischer Prozesse, welche neben einer geordneten laminaren Organisation auch eine spezifische Morphologie der einzelnen Zellen voraussetzen. Anormale Zellstrukturen können die neuronale Funktion beeinträchtigen und mit schwerwiegenden Krankheiten wie Epilepsien und Lissenzephalien verbunden sein (Cahana et al. 2001, Reid et al. 2014). Das Aktinzytoskelett ist essentiell für die Ausbildung der Zellmorphologie kortikaler Neurone (Kessels et al. 2011). Grundlage der Assemblierung von Aktinfilamenten sind dabei Aktinnukleatoren wie Cobl (Ahuja et al. 2007).

Die Rolle von Cobl und seinen Interaktionspartnern Syndapin I und Abp1 bei der Neuromorphogenese konnte bereits für primäre hippocampale Neurone *in vitro* (Ahuja et al. 2007, Pinyol et al. 2007, Dharmalingam et al. 2009, Schwintzer et al. 2011) sowie für Purkinjezellen in cerebellären organotypischen Schnittkulturen (Haag et al. 2012) gezeigt werden. Cobl-defiziente hippocampale Neurone zeichneten sich dabei durch einen Dendritenphänotyp aus, welcher durch eine Reduktion der primären Dendritenzahl und eine verringerte Verzweigungsrate gekennzeichnet war (Ahuja et al. 2007). Die Defizienz des Cobl-Interaktionspartners Syndapin I spiegelte diesen Phänotyp (Dharmalingam et al. 2009, Schwintzer et al. 2011). Der *knockdown* des Aktinnukleators Cobl sowie des mit Cobl interagierenden Proteins Abp1 führte zu einer signifikanten Reduktion der dendritischen Verzweigungspunkte sowie von Dendriten höherer Ordnungen im Cobl-ko und somit zu einer reduzierten dendritischen Komplexität (Haag et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Cobl-Expression in den Zellkörpern und in den Dendriten neokortikaler Pyramidenzellen gezeigt werden (Abb. 11). Diese befinden sich bevorzugt in den kortikalen Schichten III und V. Eine mögliche Cobl-Expression in anderen neuronalen Zellpopulationen wurde nicht untersucht.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher, den Dendritenbaum sowohl der Schicht III- als auch der Schicht V-Pyramidenzellen mit etablierten Verfahren wie der Scholl-Analyse im Detail zu charakterisieren. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung des mittleren Verzweigungsgrades des Dendritenbaumes bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Tieren gegenüber dem wt fast über den gesamten analysierten Bereich hinweg (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu unterschied sich der Verzweigungsgrad der

Schicht V-Pyramidenzellen nur in einem Abstand von 40 μm und 45 μm signifikant von wildtypischen Zellen (Abb. 15A). Einen ähnlichen Unterschied in der Ausbildung eines Phänotyps zwischen Schicht III- und Schicht V-Pyramidenzellen beschrieben bereits Rosario et al. (2012) für eine NOMA-GAP-abhängige Inhibition des Zytoskelett-assoziierten Proteins Cdc42. Analog zu den Konsequenzen eines Cobl-ko führte eine NOMA-GAP-Defizienz zu einer drastischen Veränderung der Dendritenbaummorphologie bei Schicht III-Pyramidenzellen, nicht jedoch bei Schicht V-Pyramidenzellen des sensorischen Neokortex.

Nach der globalen Beschreibung des Dendritenbaumes durch die Scholl-Analyse wurde die Struktur der Pyramidenzellen, in Anlehnung an die durch Schwintzer et al. (2011) und Haag et al. (2012) beschriebenen Cobl-Effekte auf die Dendritenmorphologie, einer Detailbetrachtung unterzogen und durch weitere Parameter ergänzt. Zunächst wurde die Anzahl der Dendriten erster Ordnung und der dendritischen Verzweigungspunkte pro Zelle bestimmt. Daran anschließend die Gesamtfilamentlänge sowie die Länge der einzelnen Dendritensegmente und der Verzweigungswinkel der Dendriten jeweils von Schicht III- und Schicht V-Pyramidenzellen. Darüber hinaus wurde die absolute Anzahl der Dendriten aller vorhandenen Ordnungen pro Schicht III/V-Pyramidenzelle zwischen den Genotypen verglichen.

Die durch vorbestehende Studien beschriebene Reduktion des Dendritenbaumes hinsichtlich der Anzahl primärer Dendriten und deren Verzweigungsrate konnte für Schicht III-Pyramidenzellen *in vivo* bestätigt werden. Der Cobl-ko war bezüglich dieser distinkten Zellpopulation durch eine dezimierte Zahl primärer Dendriten und Verzweigungspunkte pro Zelle gekennzeichnet (Abb. 19A und 19B). Weiterhin stellte sich heraus, dass der Dendritenbaum von Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Zellen eine signifikant verringerte Gesamtlänge (geringere Filamentlänge) aufwies, bei gleichzeitig nicht signifikant unterschiedlicher Länge der einzelnen Segmente (Abb. 19C und 19D). Der mittlere Verzweigungswinkel war bei Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen signifikant größer als bei wildtypischen Schicht III-Pyramidenzellen (Abb. 19E). Darüber hinaus war eine Reduktion der absoluten Anzahl der Dendriten der Ordnungen eins bis sechs bei Schicht III-Pyramidenzellen im Cobl-ko gegenüber dem wt statistisch signifikant (Abb. 20). Dendriten höherer Ordnung (vier bis sechs) waren stärker reduziert als Dendriten niedrigerer Ordnungen (eins bis drei). Die absolut geringe Anzahl an Schicht III-Pyramidenzellendendriten der siebenten bis zehnten

Ordnung im Cobl-ko beeinträchtigte das Erreichen einer statistischen Signifikanz im Vergleich der Genotypen. Alle Parameter zusammen beschreiben eine deutliche Minderung der dendritischen Komplexität von Pyramidenzellen der Schicht III durch ko des Aktinnukleators Cobl und sprechen so für Cobl als Induktor oder Erhalter der dendritischen Komplexität.

Bei der detaillierten Auswertung der Morphologie Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen konnten hingegen keine signifikanten Abweichungen in der Dendritenmorphologie gegenüber dem wt festgestellt werden (Abb. 16). Die Dendritenbäume von Schicht V-Pyramidenzellen in Cobl-ko-Mäusen waren im Vergleich zu wildtypischen Zellen nicht weniger ausgedehnt oder weniger verzweigt. Auch bezüglich der dendritischen Verzweigungswinkel, der mittleren Segmentlänge und der absoluten Häufigkeit der vorhandenen Dendritenordnungen (Abb. 17) pro Zelle unterschieden sich die Schicht V-Pyramidenzellen aus dem Cobl-ko nicht signifikant vom wt.

Auch bei detaillierterer Betrachtung der Dendritenbaummorphologie zeigten sich also drastische Veränderungen in der Struktur der Schicht III-Pyramidenzellen gegenüber dem wt, während sich die Morphologie der Schicht V-Pyramidenzellen in keinem Parameter, außer einer reduzierten dendritischen Verzweigungsrate in der Scholl-Analyse bei 40 und 45 μm , signifikant vom wt unterschied. Bemerkenswert ist allerdings die im Vergleich der Genotypen weder bei Schicht III- noch bei Schicht V-Neuronen signifikant veränderte mittlere Länge der einzelnen dendritischen Segmente.

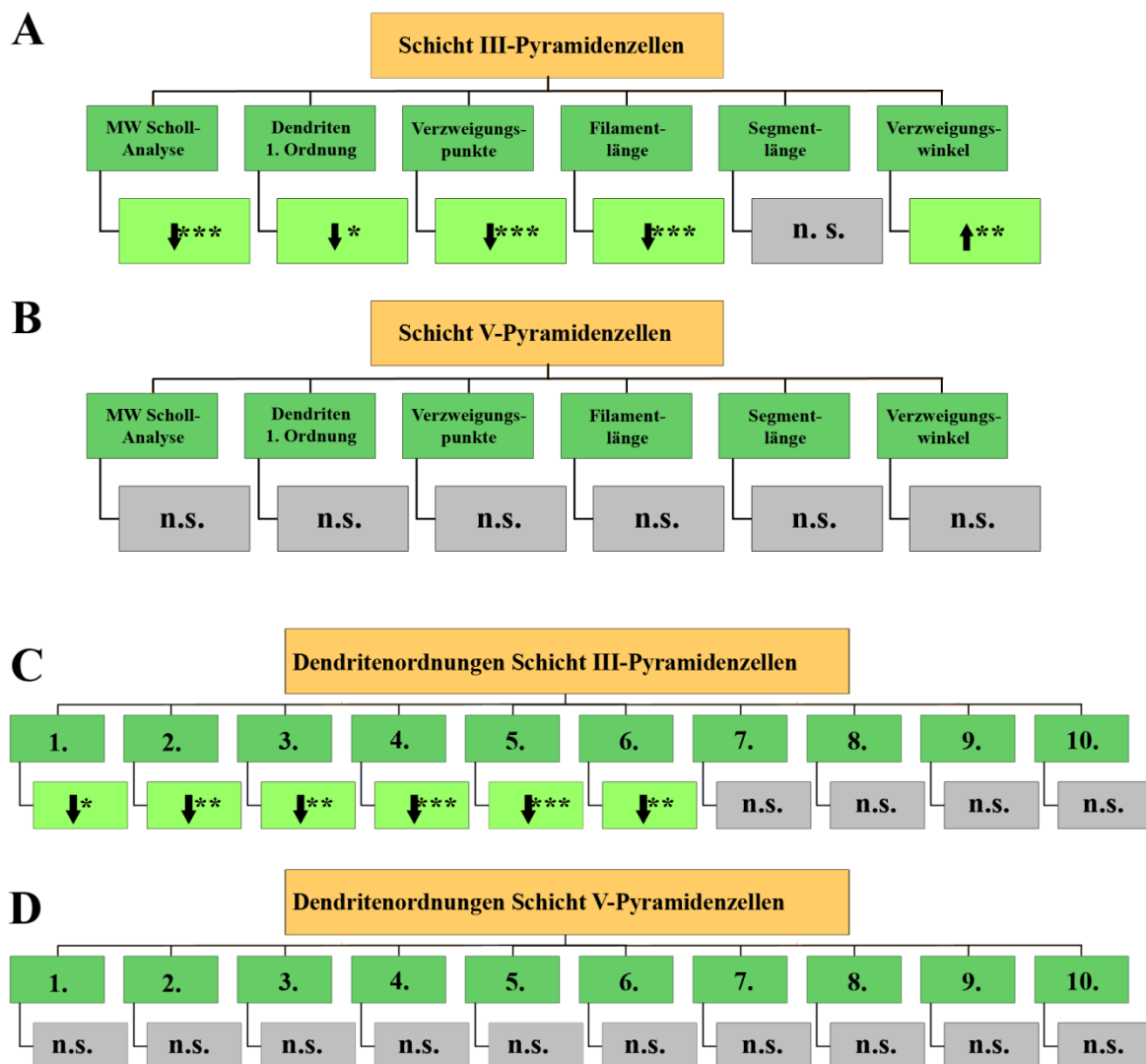


Abb. 22: Zusammenfassung der Analysen zur Pyramidenzellmorphologie. Die Grafik zeigt die Ergebnisse aller ausgewerteten Parameter zur Analyse der Morphologie Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen (**A**) bzw. Schicht V-Pyramidenzellen (**B**) als Übersicht. (**C-D**) geben eine Übersicht über die Auswertung der absoluten Häufigkeiten an Dendriten der ersten zehn Ordnungen pro Schicht III-Pyramidenzellen (**C**) bzw. Schicht V-Pyramidenzellen (**D**) im Vergleich der Genotypen. Die Untersuchung der Schicht V-Pyramidenzellen ergab auch in der Analyse der elften bis 19. Ordnung keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vergleichs der absoluten Häufigkeiten dieser Dendritenordnungen zwischen wt und Cobl-ko. Nach unten zeigende Pfeile symbolisieren eine signifikante Verringerung, nach oben zeigende Pfeile eine signifikante Vergrößerung des entsprechenden Parameters bei Schicht III/V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen gegenüber Schicht III/V-Pyramidenzellen von wildtypischen Mäusen. Angaben zu Tierzahlen und Methoden sind den Legenden der Abbildungen 16, 17, 19 und 20 zu entnehmen. Die Angaben zur Scholl-Analyse entsprechen dem Vergleich der Genotypen hinsichtlich der mittleren Anzahl der Schnittpunkte pro Zelle und Ring als Mittelwert über den Kurvenverlauf der Scholl-Analyse (Abb. 15B und 18B). Statistische Signifikanz wird in der Grafik wie folgt dargestellt: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. MW = Mittelwert, n.s. = nicht signifikant.

All diese Veränderungen zusammen beschreiben einen deutlich weniger komplexen Dendritenbaum der Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen gegenüber dem wt und zeigen so einen deutlich veränderten neuronalen Phänotyp Cobl-defizienter adulter Mäuse

gegenüber dem *wt in vivo*. In aktuellen Assoziationsstudien wurden Mutationen im *Cobl*-Gen mit dem Auftreten von Autismus in Verbindung gebracht (Hussman et al. 2011, Griswold et al. 2012). Genprodukte von anderen mit Autismus assoziierten Genen wie *Cyfp1* haben ebenfalls Einfluss auf die dendritische Komplexität von Neuronen (Pathania et al. 2014). *Cyfp1* ist ein Bestandteil des pentameren WAVE-regulierenden-Komplexes und beeinflusst die *de novo* Aktinpolymerisation indirekt über eine WAVE-vermittelte Regulation des Arp2/3-Komplexes (Pathania et al. 2014). *Cyfp1*-haploinsuffiziente hippocampale Neurone waren in der Scholl-Analyse signifikant weniger verzweigt und wiesen eine reduzierte Anzahl von Verzweigungspunkten ebenso wie eine geringere Filamentlänge auf. Eine gestörte neuronale Konnektivität aufgrund einer reduzierten dendritischen Morphologie könnte somit neuropsychiatrische Krankheitsbilder wie Autismus mit bedingen.

Cobl scheint im murinen Neokortex essentiell für die Dendritogenese und Verzweigungsrate der Schicht III-Pyramidenzellen zu sein. Die nicht signifikant verminderte mittlere Länge der einzelnen Segmente im *Cobl*-ko lässt vermuten, dass *Cobl* wahrscheinlich keinen fördernden Einfluss auf das Segmentlängenwachstum hat.

Nach einem möglichen Modell zur Erklärung der Vergrößerung des dendritischen Verzweigungswinkels bei Schicht III-Neuronen aus *Cobl*-ko-Mäusen könnte es sich um einen sekundären Effekt handeln. Aufgrund der geringeren Verzweigungsrate steht möglicherweise ein größeres Areal für die Verzweigungen der Dendriten zur Verfügung (Abb. 23).

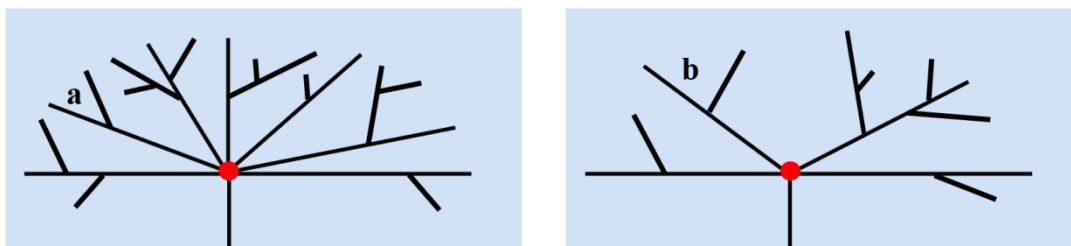


Abb. 23: Modell des veränderten Dendritenverzweigungswinkels. Die Grafik veranschaulicht schematisch die Vergrößerung des Verzweigungswinkels durch die Reduktion der dendritischen Verzweigungsrate und damit einhergehendem größeren Verzweigungsareal. Dabei stellt der linke Bildabschnitt eine Situation entsprechend dem *wt* dar, während der rechte Bildabschnitt eine reduzierte Zahl an Dendriten verschiedener Ordnungen aufweist, wie sie im *Cobl*-ko auftritt. Schwarze Linien entsprechen den Dendriten. Kleine Buchstaben markieren beispielhaft den dendritischen Verzweigungswinkel an einer dendritischen Verzweigung ($a < b$). Der rote Punkt markiert den Zellkörper.

In einer erst kürzlich durch Bielza et al. (2014) publizierten Studie konnte eine Korrelation zwischen der Dendritenordnung und dem dendritischen Verzweigungswinkel in Schicht III-Pyramidenzellen somatosensorischer Areale gefunden werden. Der

Verzweigungswinkel nahm mit zunehmender Dendritenordnung ab. Den Resultaten dieser Studie gemäß, war der Verzweigungswinkel der ersten dendritischen Verzweigung einer Schicht III-Pyramidenzelle der größte Winkel, nachfolgende Verzweigungswinkel waren zunehmend kleiner. Diese Erkenntnisse erlauben ein alternatives Erklärungsmodell zur Vergrößerung des dendritischen Verzweigungswinkels bei Schicht III-Pyramidenzellen im Cobl-ko. Schicht III-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen wiesen im Gegensatz zu Schicht III-Pyramidenzellen im wt besonders starke Reduktionen der Dendriten höherer Ordnung auf und damit auch eine besonders starke Abnahme der Verzweigungswinkel zwischen Dendriten höherer Ordnungen, was eine Vergrößerung des mittleren Verzweigungswinkels pro Zelle verursachen könnte. Schicht V-Pyramidenzellen wurden in der Studie von Bielza et al. nicht explizit betrachtet. Auffällig ist aber, dass Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen, welche keine Verringerung der Häufigkeit höherer Dendritenordnungen aufwiesen, auch keine Abweichungen im dendritischen Verzweigungswinkel gegenüber dem wt hatten.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Analysen im Rahmen dieser Arbeit sind zu den *in vitro*-Versuchen an Cobl-defizienten primären hippocampalen Neuronen durch Ahuja et al. (2007) konsistent. RNAi-vermittelter Cobl-*knockdown* führte in Zellkulturen zu einer Verminderung der Dendritenzahl und der dendritischen Verzweigungen, Cobl-Überexpression kongruent dazu zu einer erhöhten Anzahl primärer Dendriten und dendritischer Verzweigungen. Somit konnte die durch Ahuja et al. (2007) vorgeschlagene Rolle von Cobl als Verzweigungsfaktor bestätigt und auf Schicht III-Pyramidenzellen des murinen Neokortex übertragen werden. Da die Morphologie der Schicht V-Pyramidenzellen in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant beeinträchtigt war, kann dem Aktinnukleator Cobl zwar eine fundamentale, nicht aber eine global essentielle Rolle bei der Ausbildung der dendritischen Komplexität zugesprochen werden. Die Ergebnisse der Analysen zu dieser Arbeit führen zu der Erkenntnis, dass Cobl einen fördernden Einfluss auf die Initiation neuer Dendriten bzw. Verzweigungen von einem bereits bestehenden Dendriten bzw. vom Zellkörper hat.

Die Frage nach der Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen eines Cobl-ko auf die Morphologie kortikaler Schicht III- bzw. Schicht V-Pyramidenzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Die Bedeutung unterschiedlicher embryonaler Entwicklungszeitpunkte und neurogener Wachstumszonen für die Entwicklung der beiden Neuronenpopulationen sollte hier allerdings bedacht werden (Dehay und Kennedy 2007, Molyneaux et al. 2007, Kwan et al. 2012).

Besondere Beachtung muss an dieser Stelle auch die unterschiedliche Funktion der einzelnen kortikalen Schichten finden. Schicht V-Pyramidenzellen haben als Ausgangspunkt efferenter motorischer Bahnen, beispielsweise der Pyramidenbahn, besonders grundlegende Bedeutung für den motorischen Neokortex und sind dort demzufolge besonders groß (Betz-Riesenzellen). Die Schichten II-IV dienen im sensorischen Neokortex als Eingangsschichten der sensorischen Informationen aus der Körperperipherie und sind entsprechend in diesem Bereich stärker ausgeprägt als im motorischem Neokortex (Kandel et al. 1996, Squire et al. 2003, Welsch und Deller 2010). Durch die dementsprechend im sensorischen Neokortex gegenüber dem motorischen Neokortex physiologisch erhöhte Zelldichte in der Schicht IV wird der sensorische Neokortex auch als granulärer Kortex bezeichnet (Welsch und Deller 2010) und dem agranulären motorischen Kortex gegenübergestellt. Die Schicht IV ist in diesem Bereich durch ein Höchstmaß an Konnektivität der Neurone untereinander gekennzeichnet (Klinke et al. 2010). In dieser Schicht befinden sich Synapsen zwischen den Projektionsfasern aus dem Thalamus, wo die Integration der somatischen Sensibilität erfolgt, und den Dendriten der Schicht III-Pyramidenzellen (Squire et al. 2003). Die Schicht III-Pyramidenzellen dienen im Neokortex der Verknüpfung eines kortikalen Areals mit anderen kortikalen Arealen. Diese Funktion ist für die Integration peripherer sensorischer Signale unabdingbar (Squire et al. 2003, Klinke et al. 2010). Gestörte zelluläre Aktindynamik kann in einer reduzierten Komplexität der Pyramidenzellmorphologie resultieren (Rosario et al. 2012, Pathania et al. 2014), welche zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Netzbildung führen kann. Möglicherweise bedingen zytoskelettale Dysfunktionen in Bereichen sehr hoher neuronaler Konnektivität einen besonders stark ausgeprägten Phänotyp. Demzufolge manifestieren sich die Folgen der Defizienz eines Aktinnukleators im sensorischen Neokortex möglicherweise stärker an Schicht III- als an Schicht V-Pyramidenzellen. Diese These würde die Differenzen in der Ausbildung eines Phänotyps zwischen Schicht III- und Schicht V-Pyramidenzellen erklären.

8.3 Modell zu den Auswirkungen einer Cobl-Defizienz auf den murinen Neokortex

Die Struktur des Neokortex in seiner Gesamtheit wird durch die Morphologie seiner Zellen beeinflusst und sollte demzufolge im Zusammenhang mit dieser betrachtet werden. Die Analysen der Struktur des Cobl-defizienten Neokortex erbrachten einen deutlich gegenüber dem wt veränderten kortikalen Phänotyp, welcher durch eine Erhöhung der Zelldichte im medialen Bereich der Schichten III und IV und einer Ausdehnung der oberen kortikalen

Schichten (II-IV) gekennzeichnet war (Abb. 24). Die unteren kortikalen Schichten (V-VI) nahmen in ihrer Ausdehnung ab, während die Zelldichte in diesen Schichten nicht signifikant verändert war. Cobl-defiziente Pyramidenzellen der Schicht III hatten im Verhältnis zu wildtypischen Zellen weniger vom Zellkörper abgehende Dendriten, die sich auch weniger stark verzweigten. Da auch die Gesamtfilamentlänge der Schicht III-Pyramidenzellen gegenüber dem wt signifikant verringert war, kann von einer insgesamt reduzierten dendritischen Komplexität der Schicht III-Pyramidenzellen unter Cobl-Defizienz gesprochen werden. Die im medialen Bereich erhöhte Zelldichte der Schichten III und IV könnte an einem verringerten Platzbedarf der weniger komplexen Dendritenbäume der Schicht III-Pyramidenzellen liegen. Dabei bleibt unklar, ob die erhöhte Zelldichte im medialen Bereich auf einer höheren Anzahl von Pyramidenzellen oder von Interneuronen in den Schichten III und IV beruhte. In nachfolgenden Studien sollte deshalb eine mögliche Cobl-Expression in Interneuronen des Neokortex untersucht werden.

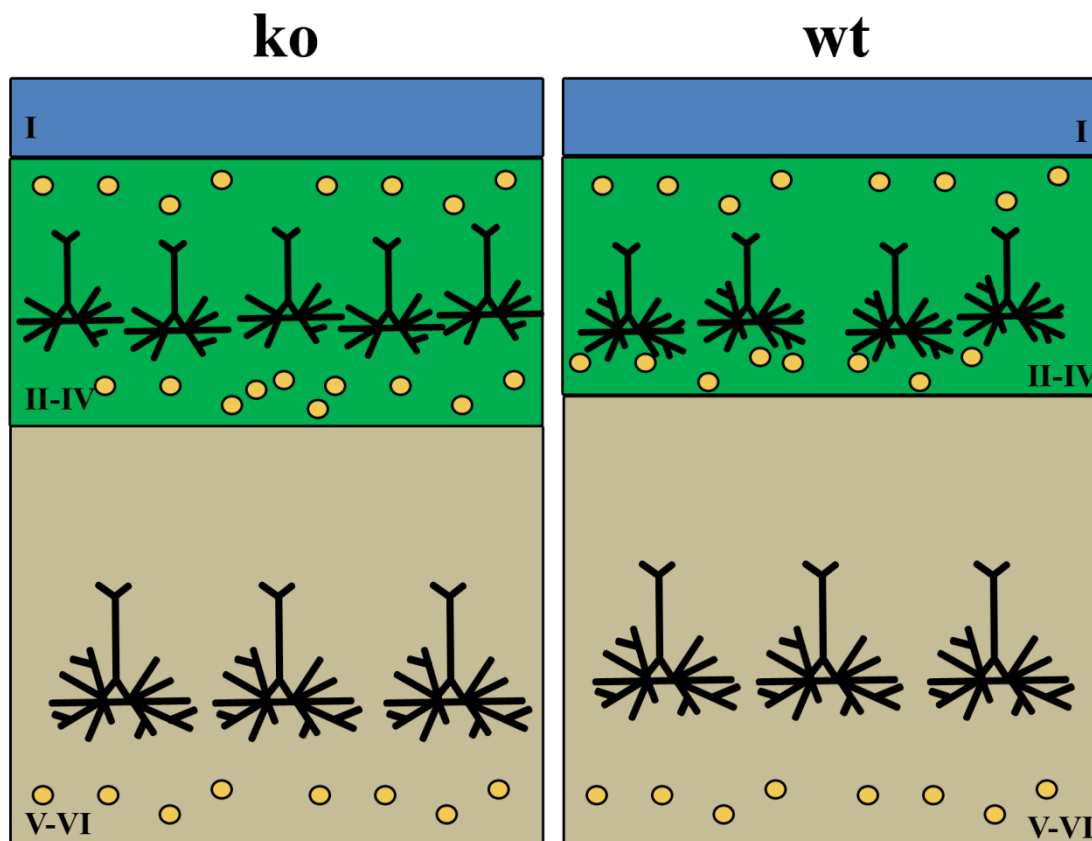


Abb. 24: Modell zu den Auswirkungen einer Cobl-Defizienz auf die Struktur des murinen Neokortex. Die Grafik zeigt schematisch das morphologische Korrelat eines Cobl-ko im Vergleich zum wt im medialen Bereich des murinen Neokortex. Die farbigen Kästen entsprechen den Kortexschichten mit den darin enthaltenen Pyramidenzellen (schwarz) und Interneuronen (gelbe Punkte). Die linke Bildhälfte veranschaulicht die Struktur bei Cobl-ko-Mäusen, die rechte Bildhälfte die in wildtypischen Tieren. Die erhöhte Zelldichte wurde nur angedeutet. Das Verhältnis der Kortexschichten ist maßstabsgerecht.

Der ko des Aktinnukleators Cobl könnte sich analog zu den Konsequenzen eines mDia1/3-ko (Shinohara et al. 2012) in einer im Vergleich zu den unteren kortikalen Schichten verstärkten Migration von Neuronen in die oberen kortikalen Schichten manifestiert haben, die eventuell infolgedessen in ihrer Ausdehnung zunahmen. Die geringere Komplexität des Dendritenbaumes der Schicht III-Pyramidenzellen und möglicherweise auch die der Interneurone in der Schicht IV könnten eine kompensatorisch erhöhte Packungsdichte der Zellen im medialen Bereich bewirkt haben. Die zellarme Schicht I blieb dabei in ihrer Ausdehnung unverändert. Eine erhöhte Migrationsrate der Neurone in die oberen kortikalen Schichten führte in diesem Modell zu einer Verringerung der Gesamtneuronenzahl in den unteren Schichten, welche aus diesem Grund bei unveränderter Zelldichte in ihrer Ausdehnung abnahmen. Der Dendritenbaum der Pyramidenzellen, die in den unteren kortikalen Schichten verblieben, wurde durch eine Cobl-Defizienz nicht beeinflusst.

9 Schlussfolgerung

Das Großhirn und hier besonders der Neokortex ist die strukturelle Grundlage höherer kognitiver Funktionen wie Bewusstsein oder Sprache und somit eine wesentliche Voraussetzung sozialer Interaktionen. Die Integration und die Verarbeitung von Sinneseindrücken durch Neurone sind die zellulären Grundlagen dieser Funktionen. Störungen innerhalb des Informationsflusses wie sie zum Beispiel bei reduzierter dendritischer oder axonaler Komplexität auftreten, können mit neuropsychiatrischen Krankheiten wie Autismus assoziiert sein (Pathania et al. 2014). Aktinzytoskelettbestandteile sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie beteiligt. Der auf WH2-Domänen basierende Aktinnukleator Cobl wurde als neuronales Protein charakterisiert, welches bereits im sich entwickelnden Embryo exprimiert wird (Gasca et al. 1995, Carroll et al. 2003) und dabei wesentliche Aufgaben bei der Ausbildung des dendritischen Nervenzellkompartiments hat (Ahuja et al. 2007, Schwintzer et al. 2011, Haag et al. 2012). Ein *knockdown* des Aktinnukleators führte in kultivierten primären hippocampalen Neuronen (Ahuja et al. 2007, Schwintzer et al. 2011) sowie in Purkinjezellen in organotypischen Schnittkulturen des Kleinhirns (Haag et al. 2012) zu einer verringerten Dendritenbaumkomplexität. Die vorliegende Arbeit beschreibt für Cobl zusätzlich eine fundamentale Rolle bei der Ausbildung der neuronalen Dendritenstruktur im Neokortex und darüber hinaus eine wesentliche Bedeutung für die Induktion oder den Erhalt der korrekten laminaren Schichtung des Neokortex. Die neuronale Expression von Cobl in neokortikalen Pyramidenzellen, welche vorrangig in den Schichten III und V lokalisiert sind, konnte durch Kolokalisationsuntersuchungen gezeigt werden. Auf subzellulärer Ebene konnten im Rahmen dieser Arbeit speziell das dendritische Kompartiment sowie der Zellkörper der kortikalen Pyramidenzellen als Cobl-exprimierend detektiert werden. Eine funktionelle Bedeutung dieses Expressionsmusters in Schicht III-Pyramidenzellen wurde durch Analysen der Dendritenbaummorphologie nach genetischem *ko* aufgezeigt. Im Gegensatz zu dieser distinkten Zellpopulation zeigte die strukturelle Untersuchung der Schicht V-Pyramidenzellen keine wesentliche Beeinträchtigung durch den Verlust der Aktinnukleatorfunktion von Cobl.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Analysen sind damit konsistent zu den *in vitro*-Versuchen an Cobl-defizienten primären hippocampalen Neuronen durch Ahuja et al. (2007) und den nach genetischem *ko* anderer, die neuronale Aktin-Polymerisation regulierender, Polypeptide (Cappello et al. 2012, Rosario et al. 2012). Die durch Ahuja et al. (2007) vorgeschlagene Rolle von Cobl als dendritischer

Verzweigungsfaktor konnte somit bestätigt und auf neokortikale Schicht III-Pyramidenzellen ausgeweitet werden.

Die Untersuchungen zur Auswirkung einer Cobl-Defizienz ergaben darüber hinaus strukturelle Veränderungen des Neokortex in seiner Gesamtheit. Die Relation der radiären Nervenzellschichten zueinander war dabei im gesamten Neokortex signifikant zugunsten der Schichten II-IV auf Kosten der Schichten V-VI verschoben. Die Erhöhung der Zelldichte in distinkten Regionen bestimmter kortikaler Schichten konnte als mögliche Ursache der Ausdehnung der oberen Schichten identifiziert werden.

Durch die Phänotypanalysen am Modell einer Cobl-ko-Maus konnte somit erstmals der Beweis einer pathophysiologischen Bedeutung der neokortikalen Cobl-Expression erbracht werden, was die Basis für weiterführende funktionelle Untersuchungen bildet. Die Einteilung der neuronalen Fehlbildungen orientiert sich zurzeit noch an der Embryogenese (Palmini et al. 2004). Die strukturellen Anomalien nach Cobl-ko konnten keiner definierten Gruppe kortikaler Malformationen eindeutig zugeordnet werden. In Zukunft könnte aber eine Einteilung der Malformationen anhand ihrer molekulargenetischen Defekte möglich werden. Hierfür legen Studien wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden die Grundlagen.

10 Literaturverzeichnis

Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2):337-350.

Angevine JBJr, Sidman RL. 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature*, 192:766-768.

Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. 2012. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*, 135(Pt 5):1348-1369.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. 1996. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics*, 27(2):59-63.

Bielas SL, Gleeson JG. 2004. Cytoskeletal-associated proteins in the migration of cortical neurons. *J Neurobiol*, 58(1):149-159.

Bielza C, Benavides-Piccione R, Lopez-Cruz P, Larranaga P, DeFelipe J. 2014. Branching angles of pyramidal cell dendrites follow common geometrical design principles in different cortical areas. *Sci Rep*, 4:5909.

Bilguvar K, Ozturk AK, Louvi A, Kwan KY, Choi M, Tatli B, Yalnizoglu D, Tuysuz B, Caglayan AO, Gokben S, Kaymakcalan H, Barak T, Bakircioglu M, Yasuno K, Ho W, Sanders S, Zhu Y, Yilmaz S, Dincer A, Johnson MH, Bronen RA, Kocer N, Per H, Mane S, Pamir MN, Yalcinkaya C, Kumandas S, Topcu M, Ozmen M, Sestan N, Lifton RP, State MW, Gunel M. 2010. Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*, 467(7312):207-210.

Bozzi Y, Casarosa S, Caleo M. 2012. Epilepsy as a neurodevelopmental disorder. *Front Psychiatry*, 3:19.

Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, Shmueli O, Sapir T, McConnell SK, Wurst W, Martinez S, Reiner O. 2001. Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and *LIS1* homodimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11):6429-6434.

- Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Brauninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB, Brakebusch C, Gotz M. 2006. The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*, 9(9):1099-1107.
- Cappello S, Bohringer CR, Bergami M, Conzelmann KK, Ghanem A, Tomassy GS, Arlotta P, Mainardi M, Allegra M, Caleo M, van Hengel J, Brakebusch C, Gotz M. 2012. A radial glia-specific role of RhoA in double cortex formation. *Neuron*, 73(5):911-924.
- Carroll EA, Gerrelli D, Gasca S, Berg E, Beier DR, Copp AJ, Klingensmith J. 2003. Cordon-bleu is a conserved gene involved in neural tube formation. *Dev Biol*, 262(1):16-31.
- Caviness VS Jr. 1982. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Brain Res*, 256(3):293-302.
- Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, Umetani J, Billadeau DD, Otwinowski Z, Rosen MK. 2010. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature*, 468(7323):533-538.
- Chereau D, Boczkowska M, Skwarek-Maruszewska A, Fujiwara I, Hayes DB, Rebowski G, Lappalainen P, Pollard TD, Dominguez R. 2008. Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science*, 320(5873):239-243.
- Conley CA, Fritz-Six KL, Almenar-Queralt A, Fowler VM. 2001. Leiomodins: larger members of the tropomodulin (Tmod) gene family. *Genomics*, 73(2):127-139.
- Dahl JP, Wang-Dunlop J, Gonzales C, Goad ME, Mark RJ, Kwak SP. 2003. Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci*, 23(8):3343-3352.
- Das RM, Storey KG. 2014. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science*, 343(6167):200-204.
- Dehay C, Kennedy H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6):438-450.
- Dharmalingam E, Haeckel A, Pinyol R, Schwintzer L, Koch D, Kessels MM, Qualmann B. 2009. F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis. *J Neurosci*, 29(42):13315-13327.

- Garrels JI, Gibson W. 1976. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*, 9(4 PT 2):793-805.
- Gasca S, Hill DP, Klingensmith J, Rossant J. 1995. Characterization of a Gene Trap Insertion into a Novel Gene, Cordon-Bleu, Expressed in Axial Structures of the Gastrulating Mouse Embryo. *Developmental Genetics*, 17(2):141-154.
- Giordano L, Vignoli A, Pinelli L, Brancati F, Accorsi P, Faravelli F, Gasparotti R, Granata T, Giaccone G, Inverardi F, Frassoni C, Dallapiccola B, Valente EM, Spreafico R. 2009. Joubert syndrome with bilateral polymicrogyria: clinical and neuropathological findings in two brothers. *Am J Med Genet A*, 149A(7):1511-1515.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. 1998. Doublecortin, a brain specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, 92(1):63-72.
- Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76:593-627.
- Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung RH, Jaworski JM, Salyakina D, Konidari I, Whitehead PL, Wright HH, Abramson RK, Williams SM, Menon R, Martin ER, Haines JL, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. 2012. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet*, 21(15):3513-3523.
- Guerrini R, Parrini E. 2010. Neuronal migration disorders. *Neurobiol Dis*, 38(2):154-166.
- Guy J, Wagener RJ, Mock M, Staiger JF. 2014. Persistence of Functional Sensory Maps in the Absence of Cortical Layers in the Somatosensory Cortex of Reeler Mice. *Cereb Cortex*.
- Haag N, Schwintzer L, Ahuja R, Koch N, Grimm J, Heuer H, Qualmann B, Kessels MM. 2012. The actin nucleator Cobl is crucial for Purkinje cell development and works in close conjunction with the F-actin binding protein Abp1. *J Neurosci*, 32(49):17842-17856.
- Hernandez-Hernandez V, Pravincumar P, Diaz-Font A, May-Simera H, Jenkins D, Knight M, Beales PL. 2013. Bardet-Biedl syndrome proteins control the cilia length through regulation of actin polymerization. *Hum Mol Genet*, 22(19):3858-3868.

- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347(6288):44-49.
- Hussman JP, Chung RH, Griswold AJ, Jaworski JM, Salyakina D, Ma D, Konidari I, Whitehead PL, Vance JM, Martin ER, Cuccaro ML, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA. 2011. A noise-reduction GWAS analysis implicates altered regulation of neurite outgrowth and guidance in autism. *Mol Autism*, 2(1):1.
- Husson C, Renault L, Didry D, Pantaloni D, Carlier MF. 2011. Cordon-Bleu uses WH2 domains as multifunctional dynamizers of actin filament assembly. *Mol Cell*, 43(3):464-477.
- Jaglin XH, Poirier K, Saillour Y, Buhler E, Tian G, Bahi-Buisson N, Fallet-Bianco C, Phan-Dinh-Tuy F, Kong XP, Bomont P, Castelnau-Ptakhine L, Odent S, Loget P, Kossorotoff M, Snoeck I, Plessis G, Parent P, Beldjord C, Cardoso C, Represa A, Flint J, Keays DA, Cowan NJ, Chelly J. 2009. Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat Genet*, 41(6):746-752.
- Jiao Y, Walker M, Trinick J, Pernier J, Montaville P, Carlier MF. 2014. Mutagenetic and electron microscopy analysis of actin filament severing by Cordon-Bleu, a WH2 domain protein. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 71(3):170-183.
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, 347(6288):37-44.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG. 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 11(1):393-412.
- Kessels MM, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Qualmann B. 2001. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol*, 153(2):351-366.
- Kessels MM, Schwintzer L, Schlobinski D, Qualmann B. 2011. Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis. *Eur J Cell Biol*, 90(11):926-933.
- Kim IH, Racz B, Wang H, Burianek L, Weinberg R, Yasuda R, Wetsel WC, Soderling SH. 2013. Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J Neurosci*, 33(14):6081-6092.

- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32:149-184.
- Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, Cushion TD, Harvey K, Topf M, Yates L, Robb S, Uyanik G, Mancini GM, Rees MI, Harvey RJ, Dobyns WB. 2010. TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. *Hum Mol Genet*, 19(14):2817-2827.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*, 139(9):1535-1546.
- Lane NJ. 1969. Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J Cell Biol*, 40(1):286-291.
- Lee JE, Gleeson JG. 2011. Cilia in the nervous system: linking cilia function and neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurol*, 24(2):98-105.
- Lee, SK, Kim DW. 2013. Focal cortical dysplasia and epilepsy surgery. *J Epilepsy Res*, 3(2):43-47.
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7):3739-3744.
- Marin-Padilla M. 1978. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol (Berl)*, 152(2):109-126
- Marin O, Rubenstein JL. 2001. A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci*, 2(11):780-790.
- Meyer G, Goffinet AM, Fairen A. 1999. What is a Cajal-Retzius cell? A reassessment of a classical cell type based on recent observations in the developing neocortex. *Cereb Cortex*, 9(8):765-775.
- Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J*, 380(Pt 1):1-17.

- Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, Meunier A, Serres C, Silbermann F, Emmerson C, Romeo K, Bourdoncle P, Schmitt A, Saunier S, Spassky N, Bastin P, Benmerah A. 2010. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci*, 123(Pt 10):1785-1795.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. 2007. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 8(6):427-437.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, 3(6):423-432.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV. 2004. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology*, 62:S2-8.
- Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, Mei D, Moro F, Veggiotti P, Marini C, Brilstra EH, Dalla Bernardina B, Goodwin L, Bodell A, Jones MC, Nangeroni M, Palmeri S, Said E, Sander JW, Striano P, Takahashi Y, Van Maldergem L, Leonardi G, Wright M, Walsh CA, Guerrini R. 2006. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain*, 129(Pt 7):1892-1906.
- Pathania M, Davenport EC, Muir J, Sheehan DF, Lopez-Domenech G, Kittler JT. 2014. The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. *Transl Psychiatry*, 4:e374.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT. 2004. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 303(5657):495-499.
- Pinto L, Gotz M. 2007. Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog Neurobiol*, 83(1):2-23.
- Pinyol R, Haeckel A, Ritter A, Qualmann B, Kessels MM. 2007. Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PLoS One*, 2(5):e400.
- Pollard TD. 2007. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36:451-477.

- Pollard TD, Beltzner CC. 2002. Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, 12(6):768-774.
- Qualmann B, Kessels MM. 2009. New players in actin polymerization- WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol*, 19(6):276-285.
- Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol Biol Cell*, 10(2):501-513.
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. 2005. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024):382-388.
- Rakic P. 1988. Specification of cerebral cortical areas. *Science*, 241(4862):170-176.
- Ravanelli AM, Klingensmith J. 2011. The actin nucleator Cordon-bleu is required for development of motile cilia in zebrafish. *Dev Biol*, 350(1):101-111.
- Reid CA, Leaw B, Richards KL, Richardson R, Wimmer V, Yu C, Hill-Yardin EL, Lerche H, Scheffer IE, Berkovic SF, Petrou S. 2014. Reduced dendritic arborization and hyperexcitability of pyramidal neurons in a *Scn1b*-based model of Dravet syndrome. *Brain*, 137(Pt 6):1701-1715.
- Rice DS, Curran T. 2001. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci*, 24:1005-1039.
- Robertson SP. 2004. Molecular pathology of filamin A: diverse phenotypes, many functions. *Clin Dysmorphol*, 13(3):123-131.
- Rooryck C, Pelras S, Chateil JF, Cances C, Arveiler B, Verloes A, Lacombe D, Goizet C. 2007. Bardet-biedl syndrome and brain abnormalities. *Neuropediatrics*, 38(1):5-9.
- Rosario M, Schuster S, Juttner R, Parthasarathy S, Tarabykin V, Birchmeier W. 2012. Neocortical dendritic complexity is controlled during development by NOMA-GAP-dependent inhibition of Cdc42 and activation of cofilin. *Genes Dev*, 26(15):1743-1757.
- Ross ME, Walsh CA. 2001. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, 24:1041-1070.

- Schüler S, Hauptmann J, Perner B, Kessels MM, Englert C, Qualmann B. 2013. Ciliated sensory hair cell formation and function require the F-BAR protein syndapin I and the WH2 domain-based actin nucleator Cobl (2013). *Journal of Cell Science*, 124(Pt 17):4059.
- Schwintzer L, Koch N, Ahuja R, Grimm J, Kessels MM, Qualmann B. 2011. The functions of the actin nucleator Cobl in cellular morphogenesis critically depend on syndapin I. *EMBO J*, 30(15):3147-3159.
- Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, Akasaka R, Nishino Y, Toyama M, Chen L, Liu ZJ, Wang BC, Yamamoto M, Terada T, Miyazawa A, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Nagayama K, Takenawa T, Yokoyama S. 2007. Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, 129(4):761-772.
- Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. 2012. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci*, 15(3):373-380, S371-372.
- Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87(4):387-406.
- Snapper SB, Takeshima F, Anton I, Liu CH, Thomas SM, Nguyen D, Dudley D, Fraser H, Purich D, Lopez-Illasaca M, Klein C, Davidson L, Bronson R, Mulligan RC, Southwick F, Geha R, Goldberg MB, Rosen FS, Hartwig JH, Alt FW. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol*, 3(10):897-904.
- Straub FB, Feuer G. 1950. Adenosine triphosphate, the functional group of actin. *Kiserl Orvostud*, 2(2):141-151.
- Takenawa T, Suetsugu S. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1):37-48.
- Taylor DC, Falconer MA, Bruton CJ, Corsellis JA. 1971. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 34(4):369-387.
- Van Troys M, Dewitte D, Goethals M, Carlier MF, Vandekerckhove J, Ampe C. 1996. The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J*, 15(2):201-210

Vartiainen MK. 2008. Nuclear actin dynamics--from form to function. FEBS Lett, 582(14):2033-2040.

Wayt J, Bretscher A. 2014. Cordon Bleu serves as a platform at the basal region of microvilli, where it regulates microvillar length through its WH2 domains. Mol Biol Cell, 25(18):2817-2827.

Wegner A. 1976. Head to tail polymerization of actin. J Mol Biol, 108(1):139-150.

Yae K, Keng VW, Koike M, Yusa K, Kouno M, Uno Y, Kondoh G, Gotow T, Uchiyama Y, Horie K, Takeda J. 2006. Sleeping beauty transposon-based phenotypic analysis of mice: lack of Arpc3 results in defective trophoblast outgrowth. Mol Cell Biol, 26(16):6185-6196.

Zheng B, Han M, Bernier M, Wen JK. 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. FEBS J, 276(10):2669-2685.

Bücher

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Hrsg. 1996. Neurowissenschaften: Eine Einführung. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. 2010. Physiologie. Sechste Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Paxinos G, Franklin KBJ, Hrsg. 2003. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Zweite Aufl. San Diego, Californien, London: Academic Press.

Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, Hrsg. 2003. Fundamental neuroscience. Zweite Aufl. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press.

Welsch U, Hrsg. 2010. Lehrbuch Histologie. Dritte Aufl. München: Elsevier.

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

- | | |
|---------|---|
| Abb. 1 | Die Aktinfilamentbildung aus monomerem G-Aktin |
| Abb. 2 | Domänenstruktur und Funktion des Aktinnukleators Cobl |
| Abb. 3 | Die Schichtengliederung des Neokortex |
| Abb. 4 | <i>Whisker barrel field</i> im sensorischen Neokortex |
| Abb. 5 | Die Entwicklung des murinen Neokortex |
| Abb. 6 | Antero-posteriore und medio-laterale Klassifikation
immunfluoreszenzmarkierter Hirnschnitte |
| Abb. 7 | Bestimmung der laminaren Organisation des Neokortex anhand
immunfluoreszenzmarkierter Gehirnschnitte |
| Abb. 8 | Laminare Organisation des murinen Neokortex |
| Abb. 9 | Analyse der Schichtenausdehnung im Neokortex von
Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wildtypischen Neokortex |
| Abb. 10 | Analyse der Kernfläche im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich
zum wt |
| Abb. 11 | Immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären und subzellulären
Expression von Cobl in Pyramidenzellen des Neokortex |
| Abb. 12 | Morphologische Darstellung individueller Neurone mittels Golgi-Färbung
und Analyse des Verzweigungsgrades nach Scholl |
| Abb. 13 | Analyse des Einflusses der Einwirkzeit der Imprägnierungslösung auf die
Dichte der Golgi-gefärbten Neurone |
| Abb. 14 | Analyse des Einflusses der Schnittdicke auf die Dichte Golgi-gefärbter
Neurone |
| Abb. 15 | Scholl-Analyse von Schicht V-Pyramidenzellen |

Abb. 16	Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen
Abb. 17	Analyse der Dendritenordnungen von Schicht V-Pyramidenzellen
Abb. 18	Scholl-Analyse von Schicht III-Pyramidenzellen
Abb. 19	Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen
Abb. 20	Analyse der Dendritenordnungen von Schicht III-Pyramidenzellen
Abb. 21	Zusammenfassung der Analysen zur laminaren Organisation des murinen Neokortex
Abb. 22	Zusammenfassung der Analysen zur Pyramidenzellmorphologie
Abb. 23	Modell des veränderten Dendritenverzweigungswinkels
Abb. 24	Modell der Auswirkungen einer Cobl-Defizienz auf die Struktur des murinen Neokortex
Abb. I	Analyse der Schichtenausdehnung im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt (in absoluten Zahlen)
Abb. II	Analyse der Zelldichte

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	primäre Antikörper
Tabelle 2	sekundäre Antikörper

11.3 Statistische Daten

11.3.1 Zusatzmaterial zu ausgewählten Abbildungen

Abb. 8: Laminare Organisation des murinen Neokortex

(A) Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm der zugehörigen SEMs von 35 frontalen, 41 medialen und 42 okzipitalen Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren.

Frontal: Ctx I $10,5 \pm 0,8 \%$; Ctx II-IV $26,0 \pm 1,3 \%$; Ctx V-VI $63,5 \pm 1,8 \%$

Medial: Ctx I $10,6 \pm 0,7 \%$; Ctx II-IV $30,9 \pm 1,1 \%$; Ctx V-VI $58,5 \pm 1,5 \%$

Okzipital: Ctx I $12,4 \pm 1,0 \%$; Ctx II-IV $33,9 \pm 0,7 \%$; Ctx V-VI $53,7 \pm 1,6 \%$

Abb. 9: Analyse der Schichtenausdehnung im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wildtypischen Neokortex

Aufgeführt ist der Vergleich zwischen wt und Cobl-ko hinsichtlich der Dicke des Gesamtkortex (A) sowie der relativen Ausdehnung der Schichten I (B), II-IV (C) und V-VI (D) in Abhängigkeit von der antero-posterioren Lokalisation der Gehirnschnitte. (E-G) Gegenüberstellung der laminaren Organisation im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt im frontalen (E), medialen (F) und okzipitalen Bereich (G). Es wurden 27 frontale, 36 mediale und 33 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen mit 35 frontalen, 41 medialen und 42 okzipitalen Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren verglichen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEMs der Mittelwerte dargestellt.

(A)

ko: frontal: $1,36 \pm 0,06$ mm; medial: $1,38 \pm 0,10$ mm; okzipital: $1,06 \pm 0,11$ mm

wt: frontal: $1,46 \pm 0,07$ mm; medial: $1,42 \pm 0,10$ mm; okzipital: $1,10 \pm 0,09$ mm

(B)

ko: frontal: $11,1 \pm 0,5 \%$; medial: $10,1 \pm 0,4 \%$; okzipital: $13,5 \pm 1,3 \%$

wt: frontal: $10,5 \pm 0,8 \%$; medial: $10,6 \pm 0,7 \%$; okzipital: $12,4 \pm 1,0 \%$

(C)

ko: frontal: $32,4 \pm 0,7 \%$; medial: $34,6 \pm 0,8 \%$; okzipital: $35,8 \pm 0,4 \%$

wt: frontal: $26,0 \pm 1,3 \%$; medial: $30,9 \pm 1,1 \%$; okzipital: $33,9 \pm 0,7 \%$

(D)

ko: frontal: $56,6 \pm 0,6 \%$; medial: $55,3 \pm 0,6 \%$; okzipital: $50,7 \pm 1,6 \%$

wt: frontal: $63,5 \pm 1,8 \%$; medial: $58,5 \pm 1,5 \%$; okzipital: $53,7 \pm 1,6 \%$

(E)

ko: Ctx I $11,1 \pm 0,5 \%$; Ctx II-IV $32,4 \pm 0,7 \%$; Ctx V-VI $56,6 \pm 0,6 \%$

wt: Ctx I $10,5 \pm 0,8 \%$; Ctx II-IV $26,0 \pm 1,3 \%$; Ctx V-VI $63,5 \pm 1,8 \%$

(F)

ko: Ctx I $10,1 \pm 0,4 \%$; Ctx II-IV $34,6 \pm 0,8 \%$; Ctx V-VI $55,3 \pm 0,6 \%$

wt: Ctx I $10,6 \pm 0,7 \%$; Ctx II-IV $30,9 \pm 1,1 \%$; Ctx V-VI $58,5 \pm 1,5 \%$

(G)

ko: Ctx I $13,5 \pm 1,3 \%$; Ctx II-IV $35,8 \pm 0,4 \%$; Ctx V-VI $50,7 \pm 1,6 \%$

wt: Ctx I $12,4 \pm 1,0 \%$; Ctx II-IV $33,9 \pm 0,7 \%$; Ctx V-VI $53,7 \pm 1,6 \%$

Abb. 10: Analyse der Kernfläche des Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt

Aufgeführt ist der Vergleich zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen hinsichtlich des prozentualen Anteils der Kernflächen in den Schichten III **(B)**, IV **(C)** und V **(D)** in Abhängigkeit von der antero-posterioren Lokalisation der Gehirnschnitte. Dabei wurden 20 frontale, 28 mediale und 28 okzipitale Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren sowie 17 frontale, 24 mediale und 21 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen analysiert. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM aufgelistet.

(B)

ko: frontal: $18,4 \pm 1,6 \%$; medial: $22,9 \pm 2,0 \%$; okzipital: $24,3 \pm 1,1 \%$

wt: frontal: $17,6 \pm 1,9 \%$; medial: $18,8 \pm 1,1 \%$; okzipital: $21,0 \pm 1,9 \%$

(C)

ko: frontal: $28,5 \pm 2,4 \%$; medial: $40,8 \pm 1,8 \%$; okzipital: $38,7 \pm 1,6 \%$

wt: frontal: $25,3 \pm 2,3 \%$; medial: $33,9 \pm 1,5 \%$; okzipital: $36,3 \pm 2,0 \%$

(D)

ko: frontal: $16,8 \pm 1,2 \%$; medial: $20,3 \pm 1,1 \%$; okzipital: $20,3 \pm 0,7 \%$

wt: frontal: $17,0 \pm 1,3 \%$; medial: $18,8 \pm 1,1 \%$; okzipital: $19,7 \pm 0,9 \%$

Abb. 15: Scholl-Analyse von Schicht V-Pyramidenzellen

Abstand vom Startpunkt	Schnittpunktzahl wt		Schnittpunktzahl ko		t-Test
	Wert	SEM	Wert	SEM	
10	6,5	0,4	6,7	0,3	0,8
15	7,3	0,4	7,6	0,3	0,5
20	8,3	0,4	8,3	0,4	0,9
25	9,7	0,4	8,8	0,5	0,2
30	10,0	0,5	9,3	0,5	0,3
35	10,2	0,6	9,3	0,4	0,3
40	10,7	0,6	9,2	0,4	0,04
45	11,0	0,7	9,1	0,5	0,02
50	10,4	0,6	9	0,5	0,1
55	9,6	0,7	8,6	0,5	0,2
60	9,3	0,8	8,3	0,5	0,3
65	8,8	0,8	7,8	0,5	0,2
70	8,3	0,9	7,4	0,5	0,3
75	7,5	0,8	6,7	0,5	0,4
80	6,5	0,6	6,1	0,5	0,6
85	6,0	0,6	5,6	0,4	0,6
90	5,2	0,5	5,4	0,5	0,8
95	4,7	0,6	4,7	0,4	0,9

Abb. 16: Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht V-Pyramidenzellen

Aufgeführt sind die Mittelwerte von 28 wildtypischen Schicht V-Pyramidenzellen sowie 50 Schicht V-Pyramidenzellen aus Cobl-ko-Mäusen (je drei männlichen Tieren pro Genotyp). Mittelwerte werden \pm der dazugehörigen SEMs aufgelistet.

(A) Anzahl der Dendriten erster Ordnung pro Schicht V-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine Anzahl von im Mittel $3,9 \pm 0,2$ Dendriten erster Ordnung pro wildtypischer Schicht V-Pyramidenzelle und $4,0 \pm 0,1$ Dendriten erster Ordnung pro Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen (n.s.; $p = 0,6$)

(B) Anzahl der Verzweigungspunkte pro Schicht V-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine Anzahl von im Mittel $21,6 \pm 1,6$ Verzweigungspunkten pro Zelle für wildtypische und $19,8 \pm 1,5$ Verzweigungspunkten pro Schicht V-Pyramidenzelle von Cobl-ko-Mäusen (n.s.; $p = 0,4$).

(C) Mittlere Filamentlänge von Schicht V-Pyramidenzellen. Es ergibt sich eine mittlere Filamentlänge von $1,22 \pm 0,06$ mm für wildtypische und $1,16 \pm 0,06$ mm für Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen (n.s.; $p = 0,5$).

(D) Mittlere Segmentlänge pro Schicht V-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine mittlere Segmentlänge von $27,5 \pm 1,3$ μ m für wildtypische und $27,8 \pm 0,8$ μ m für Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen (n.s.; $p = 0,9$).

(E) Mittlere Winkel dendritischer Verzweigungen pro Schicht V-Pyramidenzelle. Es ergibt sich ein mittlerer Verzweigungswinkel von $36,6 \pm 1,1^\circ$ für wildtypische und $35,7 \pm 0,9^\circ$ für Schicht V-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen (n.s., $p = 0,5$).

Abb. 17: Analyse der Dendritenordnungen von Schicht V-Pyramidenzellen

Dendritenordnung	Mittlere absolute Anzahl der Dendriten pro Zelle (SEM)		
	Ko	Wt	t-Test
1	4,0 (0,1)	3,9 (0,2)	0,63
2	6,7 (0,3)	7,0 (0,4)	0,64
3	8,0 (0,4)	8,9 (0,5)	0,16
4	6,9 (0,5)	7,9 (0,6)	0,25
5	5,6 (0,5)	5,5 (0,6)	0,92
6	4,2 (0,5)	3,5 (0,5)	0,34
7	2,7 (0,4)	2,5 (0,5)	0,80
8	1,5 (0,3)	1,8 (0,4)	0,56
9	0,8 (0,3)	1,0 (0,3)	0,74
10	0,7 (0,3)	0,8 (0,3)	0,92
11	0,4 (0,2)	0,8 (0,3)	0,24
12	0,2 (0,2)	0,6 (0,4)	0,25
13	0,3 (0,2)	0,3 (0,1)	1,00
14	0,2 (0,2)	0,4 (0,2)	0,68
15	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,27
16	0,1 (0,1)	0,3 (0,2)	0,50
17	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	-
18	0,04 (0,04)	0,1 (0,1)	-
19	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	-

Abb. 18: Scholl-Analyse von Schicht III-Pyramidenzellen

Abstand vom Startpunkt	Schnittpunktzahl wt		Schnittpunktzahl ko		t-Test
	Wert	SEM	Wert	SEM	
10	6,8	0,3	5,9	0,2	0,02
15	7,4	0,3	6,5	0,2	0,02
20	8,3	0,3	7,6	0,3	0,1
25	9,9	0,3	8,3	0,4	0,004
30	10,8	0,5	8,8	0,5	0,006
35	11,1	0,4	8,8	0,5	0,002
40	11,3	0,5	8,6	0,6	0,002
45	11,1	0,5	8,4	0,7	0,006
50	10,9	0,5	7,8	0,7	0,0096
55	10,8	0,7	7,6	0,7	0,002
60	10,4	0,7	7,2	0,7	0,0011
65	9,3	0,6	6,3	0,6	0,0012
70	9,0	0,6	5,8	0,6	0,0003
75	8,3	0,5	5,2	0,5	0,00014
80	7,3	0,5	4,4	0,5	0,0003
85	6,4	0,6	4,1	0,4	0,003

Abb. 19: Detailanalyse der dendritischen Morphologie Golgi-gefärbter Schicht III-Pyramidenzellen

Es sind die Mittelwerte von 32 Schicht III-Pyramidenzellen von drei wildtypischen sowie 47 Schicht III-Pyramidenzellen von drei Cobl-ko-Mäusen dargestellt. Mittelwerte werden \pm der dazugehörigen SEMs dargestellt.

(A) Anzahl der Dendriten erster Ordnung pro Schicht III-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine Anzahl von im Mittel $4,2 \pm 0,2$ Dendriten erster Ordnung pro wildtypische und $3,7 \pm 0,1$ Dendriten erster Ordnung pro Schicht III-Pyramidenzelle von Cobl-ko-Mäusen ($p = 0,02$).

(B) Anzahl der Verzweigungspunkte pro Schicht III-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine Anzahl von im Mittel $19,1 \pm 0,9$ Verzweigungspunkten pro Zelle für wildtypischer und $12,7 \pm 0,9$ Verzweigungspunkten pro Schicht III-Pyramidenzelle von Cobl-ko-Mäusen ($p = 1,2 \times 10^{-5}$).

(C) Mittlere Filamentlänge pro Schicht III-Pyramidenzelle. Es ergibt sich eine mittlere Filamentlänge von $1,19 \pm 0,05$ mm für wildtypische und $0,82 \pm 0,05$ mm für Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen ($p = 6,8 \times 10^{-6}$).

(D) Mittlere Segmentlänge von Schicht III-Pyramidenzellen. Es ergibt sich eine mittlere Segmentlänge von $28,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ für wildtypische und $28,8 \pm 0,8 \mu\text{m}$ für Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen ($p = 0,8$).

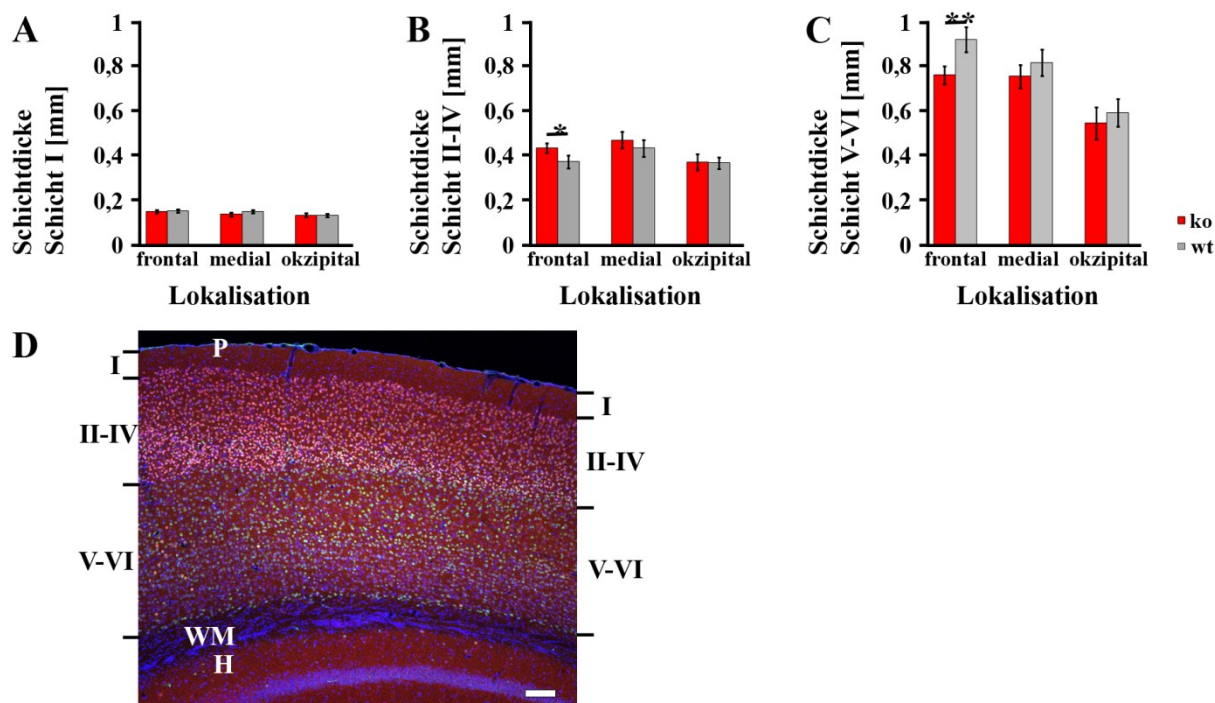
(E) Mittlere Verzweigungswinkel pro Schicht III-Pyramidenzelle. Es ergibt sich ein mittlerer Verzweigungswinkel von $28,7 \pm 0,6^\circ$ für wildtypische und $33,3 \pm 1,0^\circ$ für Schicht III-Pyramidenzellen von Cobl-ko-Mäusen ($p = 0,0011$).

Abb. 20: Analyse der Dendritenordnungen von Schicht III-Pyramidenzellen

Dendritenordnung	Mittlere absolute Anzahl der Dendriten pro Zelle (SEM)		
	Ko	Wt	t-Test
1	3,7 (0,1)	4,2 (0,2)	0,02
2	5,9 (0,2)	7,2 (0,3)	0,002
3	6,8 (0,4)	8,7 (0,4)	0,002
4	5,3 (0,5)	8,5 (0,6)	0,00013
5	3,2 (0,4)	6,4 (0,7)	0,00005
6	1,9 (0,3)	3,6 (0,5)	0,004
7	1,0 (0,3)	1,8 (0,4)	0,1
8	0,4 (0,2)	0,9 (0,3)	0,1
9	0,1 (0,1)	0,4 (0,2)	0,2
10	0,0 (0,0)	0,1 (0,1)	-

11.3.2 Zusätzliche Grafiken

Abb. I: Analyse der Schichtenausdehnung im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt (in absoluten Zahlen)



Dargestellt ist der Vergleich zwischen wt und Cobl-ko hinsichtlich der Dicke der Schichten I (A), II-IV (B) und V-VI (C) in Abhängigkeit von der antero-posterioren Lokalisation der Gehirnschnitte. Die Grafik basiert auf der Auswertung immunfluoreszenzgefärbter (anti-Cux1: rot, anti-SatB2: grün und DAPI: blau) 40 µm dicker Koronalschnitte. Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-Test* überprüft und in der Grafik als Mittelwerte \pm SEMs dargestellt. Die Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Es wurden insgesamt 27 frontale, 36 mediale und 33 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen mit 35 frontalen, 41 medialen und 42 okzipitalen Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren verglichen (4-6 Schnitte pro Tier). Statistische Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. (D) zeigt beispielhaft einen Koronarschnitt einer acht Wochen alten, männlichen, wildtypischen Maus im okzipitalen Bereich des Neokortex. Die absolute Ausdehnung der einzelnen Schichten schwankt auch innerhalb eines Kortexabschnittes aufgrund eines starken antero-posterioren Gradienten erheblich. Die relative Ausdehnung der Schichten im Verhältnis zur gesamten Neokortexdicke bleibt allerdings konstant. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. WM: *white matter* (weiße Substanz); H: Hippocampus; P: *Pia mater* (weiche Hirnhaut).

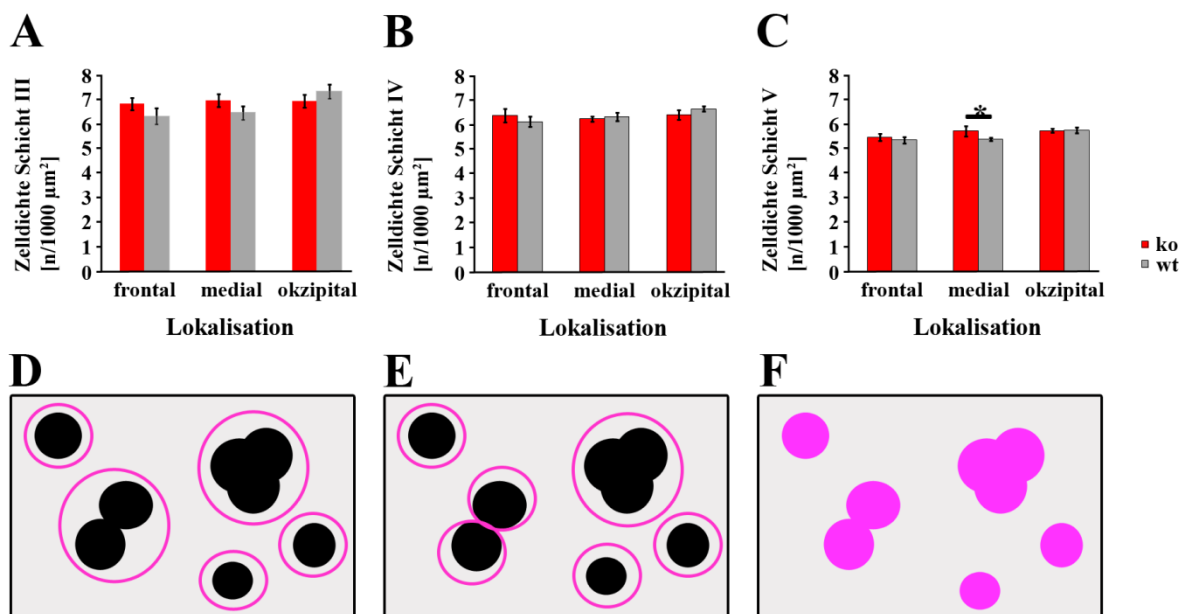
(A)

ko (Cobl-ko): frontal: $149 \pm 7 \mu\text{m}$; medial: $136 \pm 8 \mu\text{m}$; okzipital: $133 \pm 10 \mu\text{m}$ **wt (Cobl-wt):** frontal: $151 \pm 7 \mu\text{m}$; medial: $149 \pm 8 \mu\text{m}$; okzipital: $131 \pm 7 \mu\text{m}$

(B)

ko (Cobl-ko): frontal: $440 \pm 22 \mu\text{m}$; medial: $476 \pm 38 \mu\text{m}$; okzipital: $376 \pm 37 \mu\text{m}$ **wt (Cobl-wt):** frontal: $378 \pm 30 \mu\text{m}$; medial: $440 \pm 38 \mu\text{m}$; okzipital: $372 \pm 27 \mu\text{m}$

(C)

ko (Cobl-ko): frontal: $772 \pm 41 \mu\text{m}$; medial: $765 \pm 54 \mu\text{m}$; okzipital: $552 \pm 73 \mu\text{m}$ **wt (Cobl-wt):** frontal: $933 \pm 58 \mu\text{m}$; medial: $829 \pm 60 \mu\text{m}$; okzipital: $599 \pm 62 \mu\text{m}$ **Abb. II: Analyse der Zelldichte**

Die Analyse der Zelldichte im Neokortex von Cobl-ko-Mäusen im Vergleich zum wt beruht auf der Auswertung DAPI-gefärbter, 40 μm dicker Koronalschnitte (A-C). Dargestellt ist der Vergleich zwischen wildtypischen und Cobl-ko-Mäusen hinsichtlich der Zelldichte in den Schichten III (A), IV (B) und V (C) in Abhängigkeit von der antero-posterioren Lokalisation der Gehirnschnitte. Dabei wurden 21 frontale, 28 mediale und 28 okzipitale Aufnahmen von sieben wildtypischen Tieren sowie 17 frontale, 24 mediale und 21 okzipitale Aufnahmen von sechs Cobl-ko-Mäusen ausgewertet (jeweils vier bis sechs Schnitte pro Tier). Die Daten wurden mittels zweiseitigen, ungepaarten *Student's t*-Test überprüft. Die Tiere waren männlich und zwischen 8 und 22 Wochen alt. Statistische Signifikanz ist wie folgt

dargestellt: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm dazugehöriger SEMs dargestellt.

(A)

ko (Cobl-ko): frontal: $6,9 \pm 0,3$; medial: $7,0 \pm 0,3$; okzipital: $7,0 \pm 0,3$

wt (Cobl-wt): frontal: $6,4 \pm 0,3$; medial: $6,5 \pm 0,3$; okzipital: $7,4 \pm 0,3$

(B)

ko (Cobl-ko): frontal: $6,4 \pm 0,3$; medial: $6,2 \pm 0,1$; okzipital: $6,4 \pm 0,2$

wt (Cobl-wt): frontal: $6,1 \pm 0,2$; medial: $6,3 \pm 0,2$; okzipital: $6,7 \pm 0,1$

(C)

ko (Cobl-ko): frontal: $5,5 \pm 0,1$; medial: $5,7 \pm 0,2$; okzipital: $5,7 \pm 0,1$

wt (Cobl-wt): frontal: $5,4 \pm 0,1$; medial: $5,4 \pm 0,1$; okzipital: $5,8 \pm 0,1$

Die Grafik zeigt unter anderem eine über alle Neokortexbereiche hinweg bestehende niedrigere Zelldichte in der Schicht IV als in der Schicht III, ein Fehler, der entstand, da Überlappungseffekte dicht gepackter Zellkerne die Ergebnisse der Analysen verfälschten. Auch mithilfe der *watershed*-Funktion der ImageJ-Software konnte dieser Fehler nicht vollständig korrigiert werden. Die Abbildungen IID-F veranschaulichen diese Problematik und zeigen einen alternativen Auswerteparameter: Die Analyse der Kernfläche als Maß für die Zelldichte. Die schwarzen Kreise symbolisieren die DAPI-gefärbten Zellkerne, deren Dichte innerhalb einer Kortexschicht (grauer Kasten) bestimmt wurde. Magenta umrandet wurden die von der Software als „ein Kern“ definierten Strukturen (IID und IIE) bzw. die gewertete Kernfläche (IIF). Die Grafik zeigt die Auswertung mithilfe der ImageJ-Software vor (**IID**) bzw. nach Verwendung der *watershed*-Funktion (**IIE**). (**IIF**) veranschaulicht die Analyse der Kernfläche (magenta) in Prozent der gesamten betrachteten Fläche (grau).

11.4 Danksagung

Das Erstellen einer Doktorarbeit ist ein umfangreicher Prozess, welcher in der Regel erst durch die Hilfe und Unterstützung von Betreuern und Kollegen möglich ist. Aus diesem Grund möchte ich zunächst Prof. Dr. rer. nat. Britta Qualmann und PD Dr. rer. nat. Michael Kessels danken, die mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses spannenden Themas gaben und mir die Räumlichkeiten dafür zur Verfügung stellten. Ihre umfassende Betreuung, allzeit zugängliche Beratung und kritische Reflexion meiner Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Ich möchte mich auch bei allen weiteren Gutachtern bedanken, die ihre fachliche Qualifikation zum Bewerten meine Arbeit nutzen.

Durch die finanzielle Unterstützung des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) konnte ich mich für sechs Monate uneingeschränkt dem experimentellen Teil der Arbeit widmen. Dafür meinen herzlichsten Dank an die Mitglieder und an den Vorstand Prof. Dr. Otto W. Witte.

Mein Dank gebührt ebenso Dr. rer. nat. Natja Haag, die mir stets mit kompetenten Anleitungen und Erklärungen beiseite stand und mich dabei strukturiertes wissenschaftliches Forschen lehrte. Sie brachte meine Arbeit durch konstruktive Kritik voran und verstand es, mich in jeder Phase der Promotion zu motivieren.

Bei Christin Scharf möchte ich mich für die freundliche und verständliche methodische Betreuung und Hilfe bedanken. Ihre Anleitung verhalf mir zu einem gelungenen und sicheren Start in die biochemische Laborarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Dennis Koch, Dr. rer. nat. Nicole Koch, Dipl.-Biol. Eric Seemann und M. sc. Sarah Krüger, die mir im Laufe des Arbeitsprozesses unzählbar viele methodische, organisatorische und technische Fragen beantworteten und mir so bei der Auswertung der Daten halfen. Gesondert erwähnen möchte ich hierbei auch die Hilfe beim Erstellen einer Endnote-Datenbank und die Unterstützung bei der Auswertung mithilfe der Imaris-Software durch Dipl.-Mol. Med. Jaqueline Schneider.

Mein Dank auch an Dr. rer. nat. Jessica Tröger, Dipl.-Biochem. Annett Kreusch, Dr. rer. nat. Susann Schüler und alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe für ihre fachkundigen Erklärungen und auch für ihre lieben und ermutigenden Worte.

Abschließend möchte ich auch meiner Familie danken, da sie mich immer auf vielfältigste Weise unterstützten. Danke.

11.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich die folgenden Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. rer. nat. Britta Qualmann, PD Dr. rer. nat. Michael Kessels, Dr. rer. nat. Natja Haag, Christin Scharf, Dr. rer. nat. Dennis Koch, Dr. rer. nat. Nicole Koch, Dipl.-Biol. Eric Seemann und M. sc. Sarah Krüger, Dipl.-Mol. Med. Jaqueline Schneider, Dr. rer. nat. Jessica Tröger, Dipl.-Biochem. Annett Kreusch und Dr. rer. nat. Susann Schüler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Katrin Pickrodt

11.6 Lebenslauf

zur Person

Name: Katrin Pickrodt

geboren am: 04.10.1989

Geburtstort: Sömmerda

Nationalität: deutsch

Kontakt: Tel.: 01779635062
E-Mail: kati.pickrodt@gmx.de

Anschrift

Hauptwohnsitz: Rannstedter Straße 1
99610 Sömmerda

Nebenwohnsitz: Fritz-Ritter Straße 2
07747 Jena

Familienstand: ledig

Studium

Fachrichtung: Humanmedizin (9. Fachsemester) seit Oktober 2009
Physikum im September 2011 mit 1,0

Stipendium Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für
Klinische Forschung (IZKF) Jena
Oktober 2013 bis März 2014

Famulaturen:

- Katholisches Krankenhaus „St. Johann Nepomuk“ Erfurt
Abteilung: Kardiologie
- „Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern“ Linz
Abteilung: Onkologie
- „Ökumenisches Hainich Klinikum“ Mühlhausen
Abteilung: Psychiatrie und Psychotherapie
- Institut für Biochemie I Jena
- Institut für Humangenetik Münster

Schulbildung

Abitur: 2006-2009 „Friedrich Justin-Bertuch“ Schule für
Gesundheit und Soziales, Weimar
Abschluss: Abitur im Mai 2009 mit 1,0 (805 Punkte)
Hauptfächer: Mathe, Gesundheit

Realschule: 2000-2006 „Ch. G. Salzmann“ Realschule, Sömmerda
Realschulabschluss mit 1,1

Arbeitsstellen

Hilfskraft im Pflegebereich: „Sophien- und Hufeland-Klinikum“ Weimar, seit 2008

Tutor: Institut für Physiologie II Jena, seit 2011
Klinik für Neurologie Jena, seit 2013

Ort, Datum